MEMORIAS
DO
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Tomo XXIII Março — 1930 Fasciculo 3

O diagnostico da febre amarella pela dosagem da alexina (*)

por

J. da COSTA CRUZ

São até certo ponto discordantes os resultados obtidos por differentes pesquizadores quanto ao titulo e as oscillações que póde apresentar a alexina no sôro dos individuos normaes. Todavia, segundo Hayden (1), Leschly (2), Lange (3), Brinkmann (4) e Goldner (5), é muito constante o teôr em alexina d'esses sôros. A causa, a nosso ver, das divergencias assignaladas póde provir, em primeiro logar, da existencia no sôro dos individuos normaes de substancias anti-complementares, como as que se observam após as refeições copiosas de gorduras; em segundo logar, do emprego de uma technica de dosagem nem sempre uniforme e, finalmente, do esquecimento momentaneo de que a alexina humana é extremamente labil, sobretudo quando diluida em sôro physiologico.

Actualmente, a hypothese da pluralidade da alexina está posta á margem, sendo acceita por todos os auctores, quasi sem excepção, a opinião sustentada por Bordet segundo a qual essa substancia, embora complexa, é uma e unica e com maior ou menor capacidade de adhesão para os mais variados complexos antigeno-anticorpo. Dahi resulta que qualquer d'esses complexos póde servir para dosal-a, o que, de regra, se faz com os complexos hemolyticos que offerecem simplicidade de technica, rapidez e facilidade na leitura dos resultados. É indispensavel, porém, para que sejam comparaveis os resultados, usar rigorosamente o mesmo complexo nas mesmas condições de adhesão para a alexina.

De um modo geral o antigeno a empregar deve ser fortemente sensibilizado por um excesso de anticorpo e, si se quer determinar entre estreitos limites o teôr minimo de alexina de um sôro dado, deve-se empregar uma quantidade reduzida de complexo antigeno-anticorpo

(*) Recebido para publicação a 16 de Janeiro de 1930.

de tal modo escolhida que não prejudique a bôa leitura dos resultados.

A importancia d'estas considerações é fundamental para a dosagem da alexina, pois só ellas explicam as enormes differenças encontradas por varios auctores.

Com ser de considerar, em vista da quantidade variavel de hemolysinas normaes nos sôros humanos, o gráo de sensibilisação do antigeno [1] não apresenta a mesma importancia que a quantidade de antigeno sensibilizado na reacção. Com effeito, a mesma quantidade de globulos sensibilizados, ou seja 1 c. c. da emulsão a 2,5 %, em presença de 4 unidades hemolysantes ou de 40, dará para o mesmo sôro humano fresco valores sensivelmente eguaes a 0,07 e a 0,06 c. c., respectivamente, de alexina. Ao contrario, si se variar a quantidade dos globulos sensibilizados do simples ao dobro, por exemplo, empregando-se o mesmo volume de globulos a 2,5 % e globulos a 5 %, sensibilizados ambos pela mesma quantidade relativa de hemolysinas, isto é, cada qual com 40 unidades hemolysantes, encontram-se para o mesmo, sôros valores taes como 0,06 e 0,2 c. c. respectivamente (hemolyse total). Isto mostra nitidamente que a quantidade de complemento capaz de produzir a hemolyse total de um systema qualquer é, até certo ponto, proporcional á quantidade do antigeno sensibilizado [2]. Como é de prever o titulo da dosagem varia menos quando a leitura é feita pela hemolyse parcial ao envez da hemolyse total. N'esse caso, com effeito, o titulo em qualquer dos exemplos apontados acima é sensivelmente o mesmo e, si se desejasse apenas determinar o titulo absoluto em alexina, seria esse o processo a recommendar. Perdem-se com elle, entretanto, outros aspectos da reacção da dosagem que têm importancia para o estudo do sôro dos amarellentos, pois nos dois doentes que examinámos no 1º dia de molestia a alteração da alexina era por assim dizer mais qualitativa que quantitativa: ausencia de hemolyse total com 0,1 c. c. em 40 minutos, mas hemolye parcial com 0,06 c. c. que ao fim de duas horas chegou a se apresentar quasi total mesmo n'esta ultima dóse.

Sendo já discordantes os valores obtidos quanto ao teôr da alexina nos sôros dos individuos normaes, é de esperar que o não sejam menos os que se referem aos das mais variadas molestias e que, por isso, de um modo geral a dosagem da alexina não tenha tido até agora a menor utilidade como methodo de diagnostico.

Ehrlich e Morgenroth (6) observaram forte diminuição da alexina nos animaes intoxicados pelo phosphoro e esses resultados foram confirmados por varios pesquizadores. Mettalnikoff (7) e Ludke (8) encontraram diminuição da alexina nas suppurações chronicas. Bergmann e Kenthe (9) descreveram impedimento da hemolyse nas uremias, pyoemias, septicemias e molestias carcinomatosas.

Bentivenga e Carini (10) acharam o mesmo resultado nas defficiencias da nutrição; Abbot e Bergey (11) no envenenamento pelo alcool; Sweet (12) na diabetes experimental e Fassin (13) e Muller (14) na tyreoidectomia. Segundo Nagelschmidt (15) ha diminuição do poder hemolytico dos sôros pela simples acção do frio, porém Tromsdorf (16) não o observou nem pela acção do frio, da fome, da fadiga, de sangrias repetidas, do envenenamento pelo alcool ou pelo opio mesmo quando os animaes enfra-

[1] Nas nossas observações encontramos valores compreendidos entre 5 e 160 unidades.

[2] Vide Leschly. Zeitsch. f. Imm., vol. 24, pag. 499.

quecidos por essas formas entravam em agonia.

Na gravidez a alexina é normal (Ludke 17). Para Moro e Potpeschnigg (18) encontra-se augmentada nas molestias infecciosas, taes como febre typhoide, pneumonia, e tuberculose, e consideram máo o prognostico d'essas molestias quando o contrario acontece. Aben-Athar (19) observou na peste bubonica a alexina normal e só na vespera ou antevespera da morte uma baixa consideravel. Na hemoglubinuria paroxistica Meyer e Emmerich (20), Moro e Noda (21) observam falta de complemento. Na escarlatina Szimai (22) encontra a alexina normal ou augmentada e só ao fim da primeira semana ligeira diminuição.

Vincent (23) nota desapparição da alexina pela fadiga e Koch e Smith (24) pela fome. Huntemuller (25) observou diminuição da alexina nos athletas após exercicios sportivos. Goldner (5), finalmente, encontra diminuição de alexina na molestia de Basedow, na anemia perniciosa, na atrophia amarella aguda do figado, nas cirrhoses e em alguns casos de ictericias e de diabetes mellitus. Na uremia observou, pelo contrario, um augmento notavel de alexina.

Pensamos que os dados anteriores não podem ser acceitos sem reservas. As technicas empregadas variam consideravelmente; alguns auctores são omissos, outros não dosam a alexina, mas o poder hemolytico total do sôro. Os trabalhos mais recentes attendem, em geral, á necessidade de uma bôa sensibilização do antigeno, porém nenhum levou em consideração a quantidade de complexo antigenico sensibilizado na reacção o que é, como acima dissemos, o principal factor das divergencias observadas, e por conseguinte, da maior importancia si se querem obter valores comparaveis.

Em communicação feita á Sociedade Brasileira de Biologia, em 27 de Fevereiro de 1929 (26), assignalamos a consideravel diminuição da alexina que se observa no sôro fresco dos doentes de febre amarella entre o 4º e o 7º dia de molestia, isto é, no periodo que succede á crise de temperatura [3]. Posteriormente, graças á gentileza e bôa vontade dos clinicos e internos tanto do Hospital Oswaldo Cruz como da enfermaria do isolamento do Hospital S. Sebastião, pudemos fazer numerosas dosagens da alexina quer em casos de febre amarella grave, quer em fórmas benignas ou mesmo frustas e em casos meramente suspeitos em que o diagnostico clinico não chegava a determinar de modo peremptorio a natureza da molestia. Os resultados então obtidos foram resumidamente apresentados á Sociedade Brasileira de Biologia, sessão de 27 de março de 1929 (27), e são elles com os commentarios indispensaveis que constituem o objecto do presente trabalho.

Technica. — A technica usada foi a da simples determinação da quantidade minima de sôro fresco do doente capaz de determinar a hemolyse completa d'um systema hemolytico adequado. Por commodidade servimo-nos do systema hemolytico habitualmente usado na reacção de Wassermann em quasi todos os laboratorios, constituido por globulos de carneiro e sôro de coelho anti-carneiro. Attendendo a que uma alta porcentagem de sôros humanos normaes apresenta uma quantidade variavel de sensibilizadoras hemolyticas para os globulos de carneiro, tivemos sempre o cuidado de empregar no systema hemolytico um grande excesso de hemolysinas, ou sejam de 30 a 40 unidades dosadas em presença de 0,1 cc. de sôro fresco de cobaia. Todas as determinações foram feitas no volume de 4 cc. de liquido. Os globulos eram lavados quatro vezes com

---

[3] Recentemente estas observações foram confirmadas por L. Salles Gomes. Arch. de Hyg. 1929, n. 2, p. 155.

agua physiologica e a solução que nos pareceu melhor era a 2,5 %; della se usava 1 cc. em cada tubo. O sangue dos doentes, obtido por sangria da veia da prega do cotovello, era transportado immediatamente para o laboratorio, de modo que bem poucas vezes mediou mais de uma hora entre a sangria e a dosagem, precaução indispensavel em face da grande labilidade da alexina. Os sangues que não coagulavam rapidamente eram collocados ainda fluidos nos tubos de centrifugação; via de regra, durante a centrifugação o plasma coagulava dando facilmente um sôro limpido. Como era frequente esse contratempo e tambem para poupar o sôro dos doentes, as dóses empregadas na reacção, que nos pareceram sufficientes, foram de 0,2 cc., 0,15 cc., 0,1 cc., 0,08 cc., 0,06 cc. e 0,04 cc..

Collocadas essas quantidades em uma serie de tubos, addicionava-se q. s. de agua physiologica para completar 2 cc.; a seguir addicionava-se 1 cc. da solução de globulos e depois 1 cc. do sôro hemolytico préviamente dosado (30 a 40 unidades). Levavam-se os tubos ao banho maria a 37º e após 30 a 40 minutos procedia-se á leitura dos resultados.

Em geral, com um tal systema os soros normaes produzem hemolyse total com 0,06, alguns mesmo com 0,04. Na dose de 0,2 cc. a hemolyse se faz em 3 a 5 minutos na dose de 0,1 cc. em cerca de 10 minutos. Nunca observamos sôros normaes em que não houvesse hemolyse total com 0,08 e em nenhuma molestia examinada, inclusive a malaria (com excepção de 1 caso), deixou de haver hemolyse total com 0,1 cc. a não ser na febre amarella. N'esta molestia mesmo com 0,2 cc. não ha muitas vezes nem traços de hemolyse. Tomamos como fracamente positiva para febre amarella a reacção em que ha hemolyse com 0,15 e apenas hemolyse parcial ou ausencia de hemolyse com 0,1 cc. de sôro do doente; positiva a que dá hemolyse ou parcial ou total com 0,2 cc. e ausencia ou apenas traços de hemolyse com 0,15; fortemente positiva as que não dão hemolyse com 0,2 cc. ou dão apenas traços de hemolyse n'essa dose.

Todas as vezes em que procedemos a dosagens da alexina em sôros de doentes fizemol-as acompanhar por uma dosagem da alexina de um sôro normal de teôr conhecido afim de estarmos bem seguros do valor do systema hemolytico empregado. Rarissimas vezes tivemos necessidade de verificar o poder anticomplementar do sôro a examinar, o que poderá ser tambem de alguma utilidade, porque os sôros dos doentes de febre amarella, como adeante veremos, não possuem propriedades anti-alexicas.

De accôrdo com essa technica e com o criterio que estabelecemos apresentamos, nas paginas 114 a 118, os resultados obtidos para a dosagem da alexina nos doentes examinados.

Como se vê d'esta lista em todos os casos clinicamente considerados como de febre amarella não se observou a hemolyse total com 0,1 cc. de sôro fresco de doente, com excepção de um unico caso em que o teor da alexina observado foi normal, isto é 0,06. A dosagem foi repetida no dia immediato com o mesmo resultado. Vale pois a pena examinar com maior cuidado este caso. Eis resumidamente a observação conforme a papeleta archivada:

P. F. N. Doente nº. 55—Adoeceu no dia 3 de Março com dôr de cabeça, febre, molesa no corpo. A' noite vomitou claro. Entrou no hospital no dia 5 apresentando ligeira epigastralgia e ligeira ictericia ocular. N'esse dia tomou 60 cc. de sôro de cavallo anti-amarillico preparado no Instituto Oswaldo Cruz pelo Dr. H. Aragão. No dia 6 recebeu mais 60 cc. d'esse sôro subcutaneamente. No dia 7 apresentou albumina na urina + + +. A temperatura

era de 40°,2 no dia que entrou: no dia 7, em que foi feita a dosagem da alexina pela primeira vez, a temperatura era de 38°; no dia 8 em que se repetiu o exame, 37°. Teve alta curado em 14 de março.

Como se vê, este caso é clinicamente o typo do caso benigno de febre amarella e assim o consideramos nas publicações anteriores que fizemos. E' verdade que a albuminuria foi pouco intensa e appareceu tardiamente, com pouca significação para o diagnostico por ter recebido o doente nos dois dias anteriores 120 cc. de sôro de cavallo, o que por si só poderia justificar o apparecimento de albuminuria. Todavia, pareceu-nos tambem possivel que essas injecções de albumina extranha pudessem ter produzido um augmento da alexina no sôro do doente, transformando uma reacção fracamente positiva em negativa, uma vez que segundo Nolf (28) e Muller não só as injecções de plasma sanguineo como de caldo aleurona, etc. em doses massiças podem produzir um augmento transitorio da alexina do sôro em animaes de experiencia.

Recentemente, porém, por um feliz acaso encontramos no laboratorio do Dr. H. Aragão o sôro d'esse doente colhido dois mêzes após a molestia e conservado, havia 6 mêzes no frigorifico, e pudemos verificar o seu poder protector em *Macacus rhesus:*

M. rhesus nº. *52.*—Inoculado subcuteneamente em 28-II-1929 com 2 cc. de sôro de P. F. N. e, em 29-II-929, com 0,5 cc. de sangue infectante do *rhesus* nº. 48. Apresentou em 29-II, 39°,5, em 30-II, 39°,2, em 1-12, 40°,7; em 2-12, 40°,4; em 3-12, moribundo, com 35°,4. Diagnostico histopathologico: febre amarella.

O *rhesus* nº. 50, testemunha do precedente, sacrificado com 37°,5, em 3-12-929 tambem teve o diagnostico histo-pathologico de febre amarella.

Como se vê, esse sôro não exerceu nenhuma acção preventiva contra o vírus amarillico, pois nem mesmo um ligeiro retardamento do periodo de incubação se observou na infecção do *rhesus*. Pode-se pois assegurar que, não obstante os indicios clinicos, o caso d'esse doente *não foi de febre amarella,* tanto mais quanto um outro sôro de convalescente e esse de um caso muito benigno d'onde fôra possivel ao Dr. H. Aragão isolar o virus e infectar mosquitos, apezar de conservado no frigorifico ha cerca de um anno e meio, protegeu do modo o mais efficaz uma infecção amarillica em *Macacus rhesus.*

M. rhesus nº. *60*—Inoculado em 912-929 com 2 cc. de sôro do cavalescente Novelli e em 10-12-929 com 0,5, cc. de sangue infectante do *rhesus* nº 55. Não apresentou elevação de temperatura.

M. rhesus nº. *62*, testemunha do precedente, inoculado em 10-12-929, com 0,5, cc. de sangue do *rhesus* nº 55, apresentou 39°.5 em 10-12; 39°,5 em 11; 39°,6 em 12; 39°,2 em 13; 39°,6 e á tarde 40°,6, em 14; em 15, 41°. Amanheceu morto em 16-12. Diagnostico histopathologico: febre amarella.

O caso de P. F. N. é, pois, do nosso ponto de vista, muito instructivo porque nos permitte assegurar, com muita probabilidade de acerto, que não é possivel diagnosticar clinicamente febre amarella apezar de todas as apparencias quando á dosagem da alexina fornece um resultado negativo. Com effeito em nenhum caso, salvo esse, clinicamente diagnosticado de febre amarella, deixamos de ver diminuição da alexina no sôro e o estudo acabado d'esse unico caso parece mostrar que, de facto, a molestia não se apresenta sem esse symptoma constante.

DOENTES			RESULTADO DA REACÇÃO	DIAGNOSTICO CLINICO	OBSERVAÇÕES
1	A. M.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella grave	Dosagem feita no 7º dia de molestia. 14-2-929.
2	D. M.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella grave	Dosagem feita no 6º dia de molestia. 14-2-929.
3	R. M.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella benigna	Dosagem feita no 4º dia de molestia. 14-2-929.
4	A.	H. O. C.	Negativa	Individuo normal	14-2-929.
5	A. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	Dosagem feita no 7º dia de molestia. 14-2-929.
6	A. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	Dosagem feita no 4º dia de molestia. 14-2-929.
7	N. F.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella benigna	Dosagem feita no 8º dia de molestia. 14-2-929.
8	C. E. S.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella grave.	Desagem feita havia 22 dias sem febre. 14-2-929.
9	G. S.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella grave.	Dosagem feita havia 14 dias sem febre. 14-2-929.
10	M. M.	H. O. C.	Negativa	Malaria	Febril no momento da sangria. 19-2-929.
11	D. F.	H. O. C.	Negativa	Malaria	Sem febre no momento da sangria. 19-2-929.
12	O.	H. O. C.	Negativa	Malaria	Sem febre no momento da sangria. 19-2-929.
13	W. N.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella benigna	Dosagem feita havia 2 dias sem febre. 20-2-929.
14	A. P.	H. S. S.	Negativa	Convalescente febre amarella benigna	Dosagem feita havia 4 dias sem febre. 20-2-929.
15	L.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	20-2-929.
16	C. C.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	19-2-929.
17	A. D.	H. S. S.	Negativa	Cirrhose hypertrophica	Apresentava forte ictericia e falleceu 2 dias mais tarde. 20-2-929.
18	A. M.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	Não fornecia informações. Febre alta. Falleceu no dia seguinte. 20-1-929.
19	T. S.	H. S. S.	Negativa	Grippe	Estava ha 2 dias com febre. 20-2-929.

20	C.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella benigna	Dosagem feita no 6º dia de molestia. Apyretico. 24-2-929.
21	L.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella grave	Dosagem feita no 6º dia de molestia. Já estava sem febre. 24-2-929.
22	E.	H. O. C.	Negativa	Pyrexia indeterminada	Teve febre 1 dia. Ha 4 sem febre. 24-2-929.
23	S.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	24-2-929.
24	E. C.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella benigna	5º dia de molestia. Temp. 37º8. 25-2-929.
25	C. V.	I. O. C.	Negativa	Individuo normal	28-2-929.
26	A. C.	H. S. S.	Negativa	Convalescente de febre amarel a	Teve febre. No momento apyretico. 28-2-929.
27	H. F.	H. S. S.	Negativa	Nenhum symptoma de febre amarella	3º dia de molestia. Temp. 38º2. 28-2-929.
28	M. C.	H. S. S.	Positiva	Grippe	Desde a vespera sem febre. 5º dia de molestia. 28-2-929.
29	J. J.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	Na vespera 37º8. No momento apyretico. 28-2-929.
30	A. B.	H. S. S.	Negativa	Grippe	4º dia de molestia. Temp. 37º8. 28-2-829.
31	S. M.	H. S. S.	Fracamente positiva	Febre amarella	7º dia de molestia. Desde 26-2 sem febre. 28-2-929.
32	J. S.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. Temp. 39º7.
33	C. J.	H. S. S.	Negativa	Malaria	Febril. 28-2-929.
34	A. S.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	6º dia de molestia. 28-2-929.
35	G.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º ou 4º dia de molestia. 2-3-929.
36	Dr. F. M.		Negativa	Intoxicação gravidica	2-3-929.
37	Dr. H. P.		Negativa	Febre typhoide	2-3-929.
38	D. M.	H. S. S.	Positiva	Grippe	24 horas de molestia. 2-3-929.
39	M. S.	H. O. C.	Negativa	Pyrexia indeterminada	2-3-929.
40	A. F.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella	3º para o 4º dia de molestia. 2-3-929.

(Continúa)

(Continúação)

DOENTES			RESULTADO DA REACÇÃO	DIAGNOSTICO CLINICO	OBSERVAÇÕES
41	H. G.	H. S. S.	Positiva	Grippe	4º dia de molestia. 2-3-929.
42	W. M.	H. S. S.	Negativa	Convalescente de febre amarella	Apyretico havia 3 dias. 2-3-929.
43	I.	H. S. S.	Negativa	Malaria	Ha 2 dias sem febre. 2-3-929.
44	A. B.	H. S. S.	Negativa	Pyrexia indeterminada	Ha dois dias sem febre. 2-3-929.
45	M. C.	H. S. S.	Negativa	Pyrexia indeterminada	Ha 7 dias sem febre. 2-3-929.
46	M. M.	H. O. C.	Negativa	Malaria	Temp. 38º4. No momento da sangria. 6-3-929.
47	G. F.	H. O. C.	Negativa	Cirrhose, ascite, malaria chronica	Temp. 37º2 no momento da sangria. 6-3-929.
48	J. F.	H. O. C.	Negativa	Infecção chronica, febril	Temp. 37º4 no momento da sangria. 6-3-929.
49	C. M.	H. O. C.	Negativa	Convalescente ha 15 dias de febre amarella	Temp. 36º0 no momento da sangria. 6-3-929.
50	A. M.	H. O. C.	Negativa	Tuberculose pulmonar	Temp. 38º0 no momento da sangria. 6-3-929.
51	S. V.		Fracamente positiva	Malaria	2º dia de molestia. Temp. 38º5. 6-3-929.
52	A. Z.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella	6º dia de molestia. 6-3-929.
53	A. F.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella	4º dia de molestia. 6-3-929.
54	M. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. 7-3-929.
55	P. F.	H. S. S.	Negativa	Febre amarella	4º dia de molestia. 7-3-929.
56	J. B.	H. S. S.	Negativa	Grippe	2º dia de molestia. 7-3-929.
57	A. G.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	6º dia de molestia. 7-3-929.
58	F. O.	H. S. S.	Negativa	Malaria (diagnostico anatomico 9-3)	Inconsciente. Temp. 38º6. Falleceu 2 dias após 7-3-929.
59	L. R.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. Temp. 38º0. 7-3-929.
60	O. O.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	6º dia de molestia. Temp. 37º5. 7-3-929.

61	A. S.	H. S. S.	Negativa	Parotidite. Convalescente de febre amarella	7-3-929
62	A. R.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molcstia. 9-2-929.
63	J. A.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. 9-3-929.
64	J. K.		Fracamente positiva	Grippe	2º dia de molestia. 9-3-929.
65	A. J.	H. S. S.	Negativa	Pneumonia	3º dia de molestia. 9-3-929.
66	A. P.	H. S. S.	Negativa	Pyrexia indeterminada	5º dia de molestia. Temp. 39º. 9-3-929.
67	D. C.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. 9-3-929.
68	J. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	3º dia de molestia. 13-3-929.
69	E. P.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. 13-3-929.
70	L. D.	H. S. S.	Negativa	Individuo normal	13-3-929.
71	C. A.	H. O. C.	Positiva	Febre amarella	4º dia de molestia. Temp. 38º. 13-3-929.
72	A. G.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. Forma renal. Temp. 37º2 15-3-929.
73	A. S.	H. O. C.	Fracamente positiva	Febre amarella	12º dia de molestia. Ha 3 dias sem febre 15-3-929.
74	A. A. H.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. Temp. 38º. 16-3929.
75	M. G.	H. O. C.	Negativa	Tuberculose pulmonar	Temp. 37º. 15-3-929.
76	W. R.	H. O. C.	Negativa	Pleuresia	Temp. 37º8. 15-3-929.
77	J. A.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	2º dia de molestia. 2-3-929.
78	S. C.	H. S. S.	Negativa	Sarampo	8º dia de molestia. Temp. 38º2.
79	J. A.	H. S. S.	Negativa	Ictericia catarral	Temp. 39º5. 16-3-929.
80	J. F.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	4º dia de molestia. Temp. 37º8. 16-3-929.
81	S. S.	H. S. S.	Negativa	Grippe	2º dia de molestia. Temp. 38º4. 16-3-929.
82	J. S.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	6º dia de molestia. 16-3-929.
83	F. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. Temp. 39º5. 16-3-929.

(Continúa)

(Continuação)

DOENTES			RESULTADO DA REACÇÃO	DIAGNOSTICO CLINICO	OBSERVAÇÕES
84	A. P.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. Temp. 36º5. 16-3-929.
85	C. K.	H. S. S.	Fracamente positiva	Grippe	3º dia de molestia. Temp. 48º. 16-2-929.
86	M. J.	H. O. C.	Negativa	Pyrexia indeterminada	Ha dois dias sem febre. 18-5-929.
87	J. C.	H. O. C.	Negativa	Meningite c. espinhal	3º dia de molestia. 18-3-929.
88	M. G.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	
89	A. B.	H. O. C.		Pyrexia indeterminada	3º dia de molestia. 18-3-929.
90	C. C.		Negativa	Individuo normal	18-3-929.
91	J. C. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	3º dia de molestia. 19-3-929.
92	A. G.	H. S. S.	Fortemente positiva	Febre amarella †	2º dia de molestia. 19-3-929.
93	C. P.	H. S. S.	Positiva	Febre amarella	5º dia de molestia. Apyretico. 19-3-929.
94	A. B.	H. S. S.	Fracamente positiva	Febre amarella	3º dia de molestia. Temp. 39º 19-3-929.
95	F. P.	H. O. C.	Fracamente positiva	Febre amarella	3º dia de molestia. Temp. 39º5. 19-3-929.
96	P. N.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	5º dia de molestia. 19-3-929.
97	J. F.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	4º dia de molestia. 19-3-929.
98	B. S.	H. O. C.	Negativa	Malaria	22-3-929.
99	G.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	22-3-929.
100	C. C.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	22-3-929.
101	J. F.	H. O. C.	Negativa	Não é febre amarella	22-3-929.
102	A. G.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	22-3-929.
103	M. F.	H. O. C.	Fortemente positiva	Febre amarella †	22-9 929.

(Conclusão)

Nos casos em que a reacção da alexina para febre amarella foi negativa e foi feito o diagnostico clinico de outra molestia com toda precisão, encontramos augmento de alexina em um caso na pneumonia, em um caso de grippe com phenomenos pulmonares no 1º dia de molestia e em um caso de cirrhose hypertrophica (hemolyse rapida e completa com 0,04 cc. de sôro). Nos outros o teôr era normal, independentemente do sexo, isto é 0,08 ou 0,06 cc. Nos casos de malaria examinados encontramos hemolyse total com 0,1 cc. mas em 3 casos com 0,08 cc. a hemolyse não era total. Em um unico caso encontramos um doente que deu hemolyse total com 0,15 e hemolyse apenas parcial com 0,1 cc. Tratava-se de um individuo de 60 annos, escossez, nº 51 da lista anterior, no inicio de uma infestação pelo plasmodio da terçã benigna. Máo grado muitos auctores terem notado diminuição da alexina no impaludismo, pensamos que o resultado d'esse caso n'elle denuncie apenas uma insufficiencia hepatica.

Dentre os 103 casos que formam a lista acima, em 5 casos além do supra mencionado a dosagem da alexina deu um resultado positivo para febre amarella e o diagnostico clinico foi indeciso, isto é, diagnosticou-se, á falta de symptomas mais claros, grippe sem phenomenos pulmonares; são os casos nº. 28, nº. 38, nº. 41, nº. 64 e nº. 85. Foram todas as reacções positivas ou fracamente positivas em doentes que apresentaram ora ligeira albuminuria ora ligeira ictericia, com ou sem epigastralgia mas que evoluiram facilmente para a cura e de cujos sôros não nos foi possivel verificar o poder protector no laboratorio por penuria de recursos.

Em summa, dos 103 casos examinados verificou-se que uma vez a reacção foi negativa e o diagnostico clinico positivo e este ultimo era menos certo; uma vez a reacção foi positiva e o diagnostico clinico negativo e aqui com certeza o diagnostico clinico é o verdadeiro [4]. Em 5 casos a reacção foi positiva, o diagnostico clinico hesitante sem que se saiba quem tem razão.

Além d'estes ha alguns casos em que o diagnostico clinico não foi possivel e em que a reacção foi negativa para febre amarella. Aconselhados pela prudencia e dominados pelo espirito de uma justa imparcialidade queremos crêr que alguns d'esses casos, máo grado todos os exames, possam ter sido casos de febre amarella que não foi possivel apurar, e mesmo o seriam difficilmente, do ponto de vista experimental.

O certo é que, a julgar pelas observações que fizemos, nem a grippe no inicio, nem a pneumonia, nem o sarampo, nem a febre typhoide se podem confundir pela dosagem da alexina com a febre amarella. O mesmo sou forçado a dizer da malaria, si algumas conclusões quizer tirar das observações seguintes.

F. O. Doente nº. 51. Brasileiro apparentando 20 annos. Entrou a 5 de Março fortemente suspeito de febre amerella com febre alta em estado de inconsciencia. Não forneceu por isso nenhuma informação. No dia 7 foi sangrado para dosagem de alexina que existia no sôro na dose de 0,06. Falleceu em 9 de Março. Diagnostico anatomico. Impaludismo.

D. O. suspeito de febre amarella, funccionario do Instituto Oswaldo Cruz. Têm nephrite chronica. Febre, vomitos escuros; 4º dia de molestia. Dosagem da alexina negativa para febre amarella. Diagnostico clinico: malaria (terçã benigna).

Toda vez que se nos offereceu opportunidade de examinar algum doente interessante do ponto de vista da dosa-

---

[4] Por informação do Dr. Soper soubemos que o sôro d'esse doente, posteriormente examinado nos laboratorios da Inst. Rockfeller, se mostrou incapaz de proteger *M. rhesus* contra a infecção pelo virus amarillico.

gem da alexina não deixamos de o fazer e assim aqui acrescentamos algumas observações curiosas e instructivas para o criterio a adoptar no que diz respeito ao diagnostico da febre amarella pela dosagem da alexina.

1º. J. F. entrou no Hospital Oswaldo Cruz como suspeito de febre amarella. Apresenta albumina, ictericia franca. Tem febre, teve vomitos. O quadro clinico simula de tal forma o de febre amarella grave que esse diagnostico é estabelecido com confiança. A dosagem da alexina deu hemolyse total rapida com 0,2 e 0,15, hemolyse quasi total com 0,1 cc., hemolyse total com 0,08 cc. Reacção muito fracamente positiva, por assim dizer duvidosa com o criterio schematico por nós admittido de inicio.

Em todos os casos de egual gravidade sempre encontramos diminuição muito maior da alexina, isto é, ausencia de hemolyse com 0,2 cc., de modo que não hesitamos n'essa reacção duvidosa em dar um resultado negativo, resultado esse que causou surpresa aos clinicos. Dois dias depois esse doente falleceu com o diagnostico clinico de febre amarella, mas o estudo histo-pathologico excluiu de modo completo esse diagnostico. Parece ter se tratado de ictericia hemolytica, o que não se poude com certeza saber por se não ter feito a dosagem da resistencia globular em vida.

2º. G. A. do H. C. E. No decurso de um tratamento anti-syphilitico (oxycyanureto de mercurio) baixa á enfermaria com forte ictericia, vomitos, sem ter apresentado febre. Procedida a dosagem da alexina verificou-se ausencia completa de hemolyse com 0,2 cc. de sôro fresco. O doente falleceu no dia immediato e algumas visceras foram trazidas para exame no Instituto, onde foi feito pelo estudo histopathologico do figado o diagnostico de atrophia amarella aguda do figado.

Assim, pois, a atrophia amarella aguda do figado, molestia tão rara que é esse o primeiro caso archivado entre 6.000 autopsias no Instituto Oswaldo Cruz, e cuja symptomatologia é tão semelhante ao de febre amarella que os auctores francezes (Dieulafoy) a denominavam «fièvre jaune nostras», tambem se não distingue da febre amarella verdadeira pela dosagem da alexina, pelo menos nos ultimos periodos da molestia (vespera da morte). Devo todavia acrescentar que em um caso de atrophia subaguda do figado (diagnostico clinico) a dosagem da alexina foi normal, isto é, 0,06 cc. no 3º dia de molestia em um doente observado na enfermaria de isolamento do H. S. S.

3º. A. brasileira, sexo feminino, 87 annos de edade. Ha dois annos lhe foi feito o diagnostico de anemia perniciosa. Usa desde esse tempo o tratamento de Whippe que lhe proporciona os melhores resultados. No momento do exame, ha tres mezes, não faz tratamento e apresenta 1.800.000 gl. por mm³. A dosagem da alexina revela hemolyse rapida e total com 0,04 cc. Reinicia o tratamento e um mez e meio mais tarde apresenta 3.000.000 de gl. por mm³.

Assim, máo grado uma edade avançada e uma anemia perniciosa antiga, o teôr de alexina se achava normal.

4º. G. V. brasileiro, sexo masculino. Ankylostomiase grave e antiga. 900.000 gl. por mm³. Teôr de alexina 0,06 cc.; com hemolyse quasi total em 30 m.

5º e 6º. Cirrhose atrophica. Um destes doentes, do sexo feminino, com 45 annos de edade, falleceu um mez após o exame que lhe fizemos no sôro. Ambos deram hemolyse rapida total com 0,06 cc. isto é, o teôr da alexina era perfeitamente normal.

O mesmo aconteceu em um caso de kysto hydatico do figado e um caso de carcinoma extenso d'esse orgão, d'onde

se deve concluir que quando as lesões hepaticas ainda que graves são bem circumscriptas e o figado conserva elementos cellulares integros, esses elementos são em geral sufficientes para dar ao sôro um teôr normal de alexina.

Da analyse summaria desta exposição parece portanto licito concluir que o methodo da dosagem da alexina para o diagnostico da febre amarella, sem ter provavelmente um valor absoluto (atrophia aguda, malaria ?) *é de primeira importancia e melhor do que aquelles até agora postos á disposição dos clinicos* Com effeito, nas molestias febris, que de inicio mais se podem confundir com a febre amarella, não ha diminuição do teôr de alexina do sôro, havendo até, ao contrario, muitas vezes augmento. Na malaria, na maioria dos casos, a defficiencia da alexina, quando existe, é pequena e não chega a falsear os resultados para a febre amarella. Não se deve todavia esquecer que na visinhança da morte as mais disparatadas molestias (como, por exemplo, a peste) podem dar uma forte baixa do teôr de alexina. São, porém, casos que aos clinicos já nenhuma difficuldade offerecem. A reacção só têm valor durante o periodo de molestia; conforme se vê da lista acima desapparece rapidamente nos convalescentes, não podendo portanto empregar-se no diagnostico retrospectivo.

Do ponto de vista epidemiologico é preciso levar em conta a possibilidade de existirem casos levissimos, que escapem tanto ao diagnostico clinico como ao diagnostico pela dosagem da alexina, pois não possuimos elementos para excluir essa possibilidade embora tenhamos encontrado reacções positivas em dois casos benignos, no 1º dia de molestia, um dos quaes posteriormente evoluiu de um modo perfeitamente typico e havia sido examinado apenas com 6 horas de febre.

Do exame mesmo superficial da rélação dos casos que acima foram apresentados surge uma noção muito clara, que não nos impressionou logo: é a da regularidade com que a diminuição da alexina na febre amarella é proporcional á gravidade do caso.

Com effeito, todos os casos benignos deram, sem excepção, hemolyse completa ou quasi completa com 0,15 cc. e ausencia de hemolyse ou ás vezes traços de hemolyse com 0,1 cc. do sôro. Nos casos graves, pelo contrario, a diminuição da alexina era sempre mais profunda. Voltamos por isso o espirito para a applicação pratica que d'esse facto podia resultar para o prognostico.

Verificamos, realmente que todos os casos em que houve ausencia completa de hemolyse com 0,2 cc. foram casos fataes e isso não só na febre amarella como na atrophia amarella aguda do figado. No 2º dia de molestia, si ha apenas hemolyse parcial com 0,2 cc. e ausencia completa com 0,15 cc., o prognostico é da mesma forma sombrio.

A nossa convicção é que attingida uma certa baixa da alexina o teôr d'ella é incompativel com a vida, o que significa que a alexina tem physiologicamente um papel primacial na vida do individuo ou que é produzida por um orgão cuja funcção é essencial e cuja actividade se póde bem acompanhar pelo teôr da alexina no sôro.

Nos estados morbidos, em que tem sido observada, essa diminuição accentuada é um signal que se apresenta quando outros symptomas já annunciam um desenlace fatal proximo (inanição, diabetes pancreatica, peste bubonica, etc.); na febre amarella, ao contrario apresenta-se desde o 2º dia de molestia, em enfermos apparentemente em condições que semelham as de um caso benigno, onde nada faz suspeitar um resultado fatal que inesperadamente sobrevem.

Ao contrario, os casos em que no 3º

ou 4º dia de molestia se observa hemolyse total com 0,15 cc. e ausencia de hemolyse com 0,1 cc., são casos que vão evoluir benignamente, mesmo que n'esse momento se apresentem, por outros symptomas (febre alta, agitação, hemorrhagias), como fórmas clinicamente muito graves.

O exame puramente objectivo das observações que fizemos, permitte-nos affirmar, sem nenhuma duvida, que *a dosagem da alexina é um elemento de surprehendente segurança para o prognostico da febre amarella.*

Havendo verificado, logo ao exame dos primeiros casos, que os sôros dos amarellentos não apresentam propriedades anti-alexicas, nem para alexina de cobaia nem para alexina humana, pareceu-nos razoavel admittir que a diminuição da alexina era devida menos a um processo de destruição exaggerada d'essa substancia no sôro do que a uma alteração no processo de sua producção pelo organismo. Investigamos pois n'esta direcção e os resultados que obtivemos e que parecem confirmal-a, foram apresentados em sessão da Sociedade Brasileira de Biologia de Maio do corrente anno (29).

A propriedade alexica dos sôros não é, como todos sabem, o resultado da actividade de uma substancia simples, mas de um complexo de substancias, umas termolabeis, outras termoresistentes que existem sempre nos sôros normaes. Com effeito, em 1907 conseguiu pela primeira vez Ferrata (30) demonstrar que esta propriedade só se exerce pela concurrencia de duas substancias thermolabeis que se podem separar pela dialyse, pois uma d'ellas possue as propriedades physico-chimicas das globulinas e, portanto, assim tratada precipita, e a outra com propriedades das albuminas permanece soluvel. Mais tarde von Dungern (31) descobriu uma propriedade anticomplementar que Coca (32) verificou que se exercia sobre uma outra substancia, e esta thermoresistente, que pela dialyse acompanha de regra á fracção globulina dos sôros, e tambem indispensavel para que a alexina manifeste as suas propriedades. Consegue-se separal-a das outras duas de Ferrata, porque é absorvida energicamente por emulsões de levedos. Aos sôros assim inactivados pode-se regenerar a propriedade alexica por simples addição de sôro inactivado. Mais recentemente Whitehead, Gordon e Wormall (33), continuando os estudos d'este factor de V. Dungern, reconheceram a necessidade de uma quarta substancia, tambem thermoresistente, para que a alexina exerça a sua actividade. Trata-se de um elemento que acompanha na dialyse a fracção albumina de Ferrata e que se distingue, além disso, da de V. Dungern porque os sôros, d'onde é retirada pela acção de pequenas quantidades de ammonea, podem readquirir a actividade alexica pela simples addicção de sôro inactivado donde foi retirado o factor thermoresistente de V. Dungern.

As nossas investigações n'este sentido foram feitas apenas no sôro de dois doentes, pois já n'essa occasião os casos de febre amarella escasseavam muito. Os resultados foram, porém, uniformes e nos inspiram por isso grande confiança. Transcrevemos para aqui as duas analyses que apresentamos anteriormente á Sociedade de Biologia.

1ª. Sôro de doente de febre amarella de gravidade media colhido no 4º dia de molestia. Pela dosagem da alexina deu hemolyse total com 0,2 cc., hemolyse quasi total com 0,15 e ausencia completa de hemolyse com 0,1 cc. A addição de sôro humano ou de cobaia, recentemente inactivado (a 56º durante 1/2 hora) na dose de 0,2 cc. não permitte obter traços de hemolyse com 0,1 cc. de sôro do doente, o que mostra logo que não é á

falta exclusiva dos elementos thermoresistentes no sôro do doente, que se deve attribuir a ausencia da actividade alexica n'essa dose. Por sua vez a fracção globulina de Ferrata, addicionada na dose de 1 cc. a cada tubo (representando a quantidade contida em 0,1 cc. de sôro puro) não altera o titulo alexico do sôro do doente; ao contrario, a addição de 1 cc. da fracção albumina de Ferrata permittiu observar hemolyse total do systema hemolytico empregado, sempre o mesmo, até com a dose 0,005 cc. de sôro do doente.

O segundo sôro examinado sob este ponto de vista era o de um doente no 4º dia de molestia e que falleceu dois dias após. Pela dosagem da alexina não se observou nem mesmo traços de hemolyse com 0,2 cc. Como no primeiro caso o titulo alexico do sôro não se modificou pela addição de sôro humano ou de cobaia, recentemente inactivado, nem pela addição da fracção globulina de Ferrata. A addição da fracção albumina pelo contrario produziu hemolyse total até a dose de 0,04 cc. de sôro do doente. E' bem de ver n'estas experiencias que a separação das fracções de Ferrata era perfeita e que a fracção albumina, mesmo na dose dupla da empregada, isto é, na dose de 2 cc., era incapaz por si só de produzir traços de hemolyse com o systema hemolytico.

A technica que empregamos para separação d'estas duas fracções foi a de Liefmann, modificada por Braun (34), que consiste no seguinte:

Diluir o sôro fresco na razão de 1/10 com agua distillada gelada. Fazer passar durante 10 a 15 minutos uma corrente de gaz carbonico no liquido que se mantem em temperatura baixa durante toda a operação. O liquido fortemente turvo que se obtem por precipitação das globulinas é centrifugado durante 5 minutos a 3.500 rotações. O liquido que sobrenada, contendo 10 cc. da fracção albumina diluida a 1/10, é addicionado de 1 cc. de uma solução a 8,5 % de chloreto de sodio, afim de reconstituir a isotonia, e é em seguida libertado do gaz carbonico por agitação e por transvasamentos repetidos de um tubo para outro. Essa fracção deve ser conservada immersa num vaso com agua gelada.

O deposito da centrifugação é lavado duas vezes consecutivas com agua distillada gelada e depois cuidadosamente dissolvido em agua physiologica.

Com este methodo sempre conseguimos não só uma separação facil e completa, mas tambem a obtenção das fracções perfeitamente activas, tanto com alexina humana como com alexina de cobaia, que ambas foram empregadas nas experiencias acima referidas com os sôros dos dois doentes.

Em summa no sôro dos doentes de febre amarella os elementos thermoresistentes bem como a fracção globulina thermolabil da alexina existem em quantidade apreciavel, embora se haja observado uma differença sensivel entre os sôros dos dois doentes observados; si elles não produzem a hemolyse, devem-no sobretudo á ausencia da fracção albumina.

Em face d'esses resultados fomos levados a verificar o teôr da fracção globulina nos sôros normaes. Em dois sôros, cujo titulo alexico era 0,06 cc., observamos hemolyse total com 0,01 cc. pela addição da fracção albumina, o que mostra que tambem nos individuos normaes existe uma maior quantidade da fracção globulina da alexina do que da fracção albumina e que, quando se dosa como habitualmente a alexina, o titulo da dosagem correspondente apenas a quantidade da fracção albumina existente nesses sôros.

——

Quando se procura investigar o mechanismo e a causa da diminuição da

alexina no sôro dos doentes de febre amarella, varias hypotheses accódem ao espirito como verosimeis: fixação *in vivo* da alexina sobre um complexo antigeno-anticorpo; em face do papel que o figado indiscutivelmente desempenha como orgão productor da alexina, filiar a uma insufficiencia hepatica a defficiencia da alexina observada; attribuir ás alterações da coagulabilidade do sangue, de longa data observados na febre amarella (S. F. da Cunha (35), 1723) as modificações da alexina, si se acceita inicialmente a hypothese de que a alexina participa do processo de coagulação ou durante elle se forma.

A favor da primeira hypothese falam algumas observações feitas em 1903 pela commissão franceza composta de Marchoux, Salimbeni e Simond (36), d'onde parece poder deprehender-se que já nos primeiros dias da molestia, quando o sangue é seguramente infectante, se encontram no sôro dos doentes propriedades preventivas, isto é, concomitantemente em circulação o agente infeccioso e seu anticorpo especifico. Ora, todos os auctores unanimemente admittem, não só a possibilidade da sensibilisação dos antigenos *in vivo*, como tão claramente demonstrou por exemplo Gabritschewsky (37) no decurso da spirochetose recurrente, como tambem, facto repetidamente comprovado por muitos pesquizadores, que a introducção directa de antigenos sensibilisados na circulação de animaes de experiencia accarreta immediatamente uma baixa no teôr de alexina d'esses animaes, o que equivale dizer que sobre esses complexos tanto *in vitro* como *in vivo* se adsorve a alexina.

A nosso ver não se pode excluir, portanto, a intervenção deste mechanismo como responsavel, ao menos em parte, pela defficiencia da alexina, tanto mais quanto recentemente Frobisher (38) parece ter conseguido realisar a reacção de fixação da alexina *in vitro*, na febre amarella.

Outros factos além d'isso falam no mesmo sentido: na febre amarella do homem a diminuição da alexina é precoce e, como se vê da lista que apresentamos, já se pode observar ás vezes nas primeiras 24 horas de molestia. E' difficil admittir que n'esse periodo de molestia, essa diminuição seja devida a uma alteração anatomica do figado e parece mais legitimo acceitar que, pelo menos, n'essa primeira phase essa defficiencia se deva á fixação da alexina *in vivo* sobre um complexo antigeno-anticorpo. Por outro lado, no *Macacus rhesus*, nos primeiros dois dias de febre (se a crise de hypothermia não sobrevem antes) não se observa diminuição da alexina senão de modo inconstante. Ora, a febre amarella n'esses animaes é a reproducção exacta da molestia no homem com a differença que n'elles a reacção é mais precaria, a formação de anticorpos mais lenta como mostra a longa permanencia do virus no sangue e sobretudo a infecciosidade das visceras após a morte, de modo que a intoxicação mais grave é quási sempre mortal não dando tempo, por exemplo, a que se observem os phenomenos de incoagulabilidade do sangue senão quando a morte não sobrevem logo e o animal resiste muitas horas em hypothermia [5]. Ahi então o sangue permanece longo tempo fluido, coagulando lentamente em coagulos frouxos, como no homem, após o 4º dia de molestia, dando um sôro em que se observa uma baixa

[5] Por vezes nos *rhesus* o sangue se comporta muito semelhantemente ao do homem. Eis um exemplo: *rhesus* 67: 0,1 cc. hemolyse total; 0,08 h. quasi total; 0,04 cc., ausencia de hemolyse. Inoculado com virus amarillico (mosquitos infectados) quatro dias após apresenta pela manhã 41º de febre. Dosagem da alexina: 0,1 cc. h. total; 0,08 h. q. t.; 0,04, ausencia de hemolyse. No dia seguinte temperatura 40º,5. Dosagem de alexina: 0,2 cc. h. t.; 0,15 hemolyse parcial; 0,1 cc. ausencia de hemolyse. No outro dia temp. 39º,9, sangue quasi incoagulavel, ausencia de hemolyse com 0,2 cc.

profunda da alexina (ausencia de hemolyse por vezes com 0,8 cc. de sôro puro). Pensamos por isso que entre a precocidade da diminuição da alexina e a precocidade de formação de anticorpos na febre amarella no homem, assim como, parallelamente, a falta desses dois phenomenos na febre amarella dos *rhesus*, existe uma relação intima que não é apenas méra coincidencia. Attendendo, pois, a essas considerações é nossa opinião que n'esse periodo a diminuição da alexina possa correr por conta de uma reacção especifica no sôro do doente e contribuir para mais tarde determinar os phenomenos de choque anaphylactico (Sinval Lins (40)) que apparecem com a crise de temperatura (leucopenia, queda da pressão arterial, incoagulabilidade do sangue removivel como a do plasma de peptona pelos agentes thromboplasticos, desapparição quasi completa da alexina, hypothermia, etc.).

——

O papel do figado como orgão essencial na producção da alexina foi posto em evidencia por Nolf (39), de um modo que não deixou margem a nenhuma duvida. Muller (14), mais tarde, em magnifico trabalho não só confirmou os resultados de Nolf como conseguiu mesmo obter producção de alexina de figados isolados de animaes e mantidos vivos á custa de uma circulação artificial.

Ora, na febre amarella o figado é sempre lesado e essas lesões não raro se extendem a todo o parenchyma hepatico. Não é crivel que assim sendo deixe de haver uma forte insufficiencia hepatica na febre amarella. E' verdade que a resultado contrario chegou Lins (40) submettendo-se varios enfermos ás provas de levulosuria e galactosuria.

O facto de que no inicio da convalescença de casos benignos Lins encontra com essas provas uma insufficiencia hepatica manifesta no mesmo doente que durante o periodo de molestia dias antes deu um resultado negativo, leva-me a crêr que a insufficiencia hepatica na febre amarella é com effeito consideravel, e que só essas provas de exploração hepatica na febre amarella são impraticaveis deante da intolerancia gastro-intestinal dos doentes. As mesmas lesões renaes que, ás vezes, são a causa immediata da morte são provavelmente resultado da intoxicação geral devida á deficiencia das funcções hepaticas como é provavelmente tambem o caso na atrophia amarella aguda do figado.

Como vimos acima, na febre amarella o que desapparece da alexina é apenas a sua fracção albumina; pois se dos trabalhos de Muller se verifica que nenhum orgão com excepção do figado é capaz de produzir alexina, os de Olsen (41) mostram que emquanto orgãos diversos, como o figado e baço, podem fornecer a fracção globulina, só o figado produz a fracção albumina. Não nos resta portanto a menor duvida de que a diminuição da alexina na febre amarella, pelo menos depois da crise que S. Lins com tanta felicidade approximou do choque anaphylatico, é um reflexo da debilidade funccional do figado. Julgamos mesmo possivel que desde a primeira phase da molestia, de par com uma fixação especifica *in vivo*, contribua tambem para a diminuição da alexina a incapacidade funccional em que já se possa encontrar esse orgão, e se como acima affirmámos e convictamente acreditamos a dosagem da alexina é de um alto valor para o prognostico na febre amarella, somos forçados a admittir que *a pathologia d'essa molestia gira exclusivamente em torno d'essa viscera e que é por conseguinte exclusivamente em consequencia da insufficiencia hepatica que os doentes morrem.*

——

A idea de que o teôr em alexina do sôro está na dependencia do processo de

coagulação do sangue deve-se a Metchnikoff. Todavia a opinião d'esse autor, segundo a qual a alexina é originaria dos leucocytos, cahiu em completo descredito, não sem um grande esforço e um grande dispendio de trabalho feito por parte de numerosos pesquizadores. Não só nos plasmas obtidos em tubos parafinados como pela addição de oxalatos e citratos, mas mesmo nos plasmas obtidos dentro dos vasos para impedir qualquer principio de coagulação, o teôr em alexina é sensivelmente egual. De modo que a questão neste particular está hoje bem resolvida. Mas se esta ideia foi abandonada, as relações, que acaso possam existir entre a coagulação do sangue e a alexina são ainda ponto de duvida.

Desde 1908 Bordet e Delange (42) mostram-se impressionados pela semelhança de propriedades physico-chimicas entre a alexina e o constituinte albuminoide da thrombina, mas pronunciam-se contra a sua identidade. Recentemente Fuchs, Hartmann e Falkenhausen (43), em numerosas publicações, insistem no assumpto e tendem a concluir das suas experiencias que a alexina ou um dos seus constituintes, a fracção globulina (Mittelstuck), é tambem o constituinte albuminoide da thrombina (thrombogeno de Morawitz, serosima de Bordet e Delange, plamosina de Fuld e Spiro).

Abordamos tambem o assumpto neste particular por nos parecer que o sangue dos amarellentos poderia talvez contribuir para esclarecer este ponto. Das experiencias que executamos parece-nos licito concluir que, de facto, nem a fracção globulina, nem a fracção albumina da alexina representam o serosima. Com effeito, obtivemos um resultado sempre uniforme com a experiencia a seguir:

Em uma serie de 5 tubos collocam-se 0,5 cc. de plasma de coelho oxalatado a 1 por 1000 tratado pelo phosphato tricalcico, isto é, isento de serosima. Ao primeiro tubo addiccionam-se a seguir 1 cc. de agua physiologica e 2,5 cc. de uma solução de chloreto de calcio (77 partes de agua physiologica e 33 de chloreto de calcio a 1 %). Ao segundo tubo 1 cc. da fracção globulina da alexina (obtida pelo processo referido de Liefmann modificado por Braun, de plasma fresco de cobaia e oxalatado a 1 por 1000 e centrifugado 2 horas a 3.500 rotações) e 2,5 cc. de solução de calcio; ao terceiro tubo 1 cc. da fracção albumina do mesmo plasma oxalatado de cobaia e 2,5 cc. de solução de calcio; ao 4º juntaram-se 0,5 cc. da fracção globulina, 0,5 cc. da fracção albumina e 2,5 cc. da solução de calcio.

Resultado: no 3º tubo coagulação em 25 minutos, no 4º coagulação em 30 minutos. Os dois primeiros mantem-se fluidos mesmo após 24 horas.

E' pois evidente que a fracção globulina do plasma oxalatado de cobaia não contem o serosima que fica todo na fracção albumina.

Com o intuito de verificar si havia na fraccção albumina, não serosima mas thrombina já formada, foi feita a seguinte experiencia:

A uma serie de 5 tubos collocaram-se 0,5 cc. de plasma de coelho oxalatado a 1 por 1000. Addicionou-se ao 1º 1 cc. de agua physiologica; ao 2º 1 cc. da fracção globulina; ao 3º 1 cc. de fracção albumina e ao 4º 0,1 cc. de sôro fresco de cobaia.

Resultado: Coagulação no 4º tubo ao cabo de 12 minutos. Nos outros tres não houve coagulação mesmo após 6 horas. [6]

Em todas as experiencias de separação das fracções da alexina foram feitas testemunhas para demonstração de que

[6] Convem acrescentar que por prolongada que seja a centrifugação do plasma de cobaia não se consegue impedir na fracção albumina a formação lenta de trombina. N'ella fica tambem algum fibrinogenio, de modo que de um dia para outro n'ella apparece um pequeno coagulo de fibrina.

a separação era perfeita e que ambas se mantinham activas, isto é, verificava-se que addicionadas a globulos sensibilisados de carneiro nenhuma d'ellas separadamente mesmo na dose de 2 cc. dava traços de hemolyse ao passo que addicionadas na dose 1 cc. cada uma aos mesmos globulos sensibilisados a hemolyse era total ao fim de 15 a 20 minutos. Resulta pois que se algumas das fracções do complemento é um dos constituintes de thrombina só o pode ser a fracção albumina.

Quando não se ignora que o processo da hemolyse especifica determinado pela fracção albumina da alexina consiste provavelmente n'uma coagulação do stroma dos globulos, como parece resultar de algumas observações de Bordet (42) a hypothese de que essa mesma substancia determine a coagulação do fibrinogenio é muito attrahente. Entretanto uma experiencia já antiga de Bordet e Delange (42) falla contra essa maneira de ver e é que, si se retira de um sôro rico em serosima a alexina por meio de globulos sensibilizados, o liquido mostra ainda presença de serosima e é capaz de formar thrombina pela addicção de citosima.

Retomamos esta experiencia com o intuito de verificar se, sendo a mesma substancia a fracção albumina e o serosima, a presença de serosima se revela em titulo muito inferior ao da fracção albumina na hemolyse. Não é o caso.

Si se possue um plasma oxalatado de cobaia, que produz a hemolyse na dose de 0,02 e a coagulação do plasma phosphatado na dose de 0,01 cc., e si a elle se addicionam globulos sensibilizados em excesso e após uma hora de estufa a 37º se centrifuga, vê-se que mesmo na dose de 0,1 cc. esse liquido é incapaz de produzir a hemolyse de globutos hypersensibilisados (globulos + sensibilizadora + fracção globulina da alexina) e não obstante na dose de 0,01 cc. continua a produzir a coagulação do plasma phosphatado recalcificado.

A' mesma conclusão leva o estudo do sôro dos doentes de febre amarella. Dada a escassez dos doentes só um sôro pudemos examinar n'este sentido. Esse sôro na dose de 0,2 cc. não dava mesmo traços de hemolyse com o systema hemolytico que sempre empregamos, mas pela addição da fracção albumina da alexina de cobaia era activo até a dose de 0,04 cc. O serosima d'esse sôro foi facilmente revelado em plasma de coelho phosphatado e recalcificado até com 0,01 cc., dose que tambem encontramos em dois sôros de individuos normaes.

E' sabido que a incoagulabilidade do sangue na febre amarella é devida em grande parte á existencia de anti-thrombina como o demonstrou Vellard e Vianna (45) e nós tivemos tambem opportunidade de observar.

Das nossas experiencias tambem, como acabámos de ver, chega-se á conclusão de que o constituinte albuminoide da thrombina pode conservar um teôr normal em um sôro que mostra uma baixa consideravel da alexina tanto em relação á fracção albumina quanto mesmo á fracção globulina.

Parece pois que estas observações afastam completamente a hypothese da participação dos constituintes do complemento na formação da thrombina e, portanto, que o processo de diminuição da alexina nenhuma relação immediata apresenta com as alterações da coagulabilidade do sangue na febre amarella.

CONCLUSÕES

1 .—Accentua-se a importancia da quantidade absoluta de globulos sensibilizados, na dosagem da alexina quando se quer obter valores comparaveis pela leitura da hemolyse total.

2 .—Na febre amarella a diminuição do poder alexico do sôro é um symptoma

constante, ás vezes mesmo já presente nas primeiras horas de molestia. Em um unico caso o teôr alexico foi normal e o diagnostico clinico de febre amarella parecia justificado. Ficou demonstrado no presente trabalho que o sôro desse doente não apresentou posteriormente propriedades preventivas, de modo que não se tratava com effeito de febre amarella.

3 .—Embora sem nenhum elemento de prova, considera-se possivel a existencia de casos frustos em que tanto pela dosagem da alexina como pelos symptomas clinicos seja impossivel fazer o diagnostico de febre amarella.

4 .—Nos convalescentes de febre amarella o teôr alexico normal do sôro se reconstitue rapidamente. A dosagem da alexina não serve por isso para o diagnostico retrospectivo da molestia.

5 .—Existem estados morbidos distinctos de febre amarella, embora constituam raridade, em que a diminuição da alexina é pronunciada (atrophia amarella agúda do figado, intoxicações, malaria (?)) mas no inicio das molestias infecciosas agúdas (grippe, pneumonia, sarampo, febre typhoide, etc.) foi pelo contrario observado um ligeiro augmento do teôr alexico dos sôros.

6 .—Observou-se sensivel baixa da alexina em um unico enfermo de malaria que com certeza nunca teve febre amarella.

7 .—Em 5 outros casos se encontrou o teôr alexico diminuido e o diagnostico clinico foi *grippe* embora sem symptomas pulmonares. Não foi possivel verificar o poder preventivo d'esses sôros e portanto excluir a possibilidade da febre amarella.

8 .—Do exame, portanto, dos 103 casos observados, a concordancia do diagnostico clinico com o da dosagem da alexina foi de 93,27 %. Dos 6,8 % de discordancias, em 0,97 % o diagnostico pela dosagem da alexina foi negativo e o diagnostico clinico positivo, mas este estava errado; em 0,97 % o diagnostico pela dosagem da alexina foi positivo e o diagnostico clinico negativo estava sem nenhuma duvida certo; em 4,85 % o diagnostico pela dosagem da alexina foi positivo ao passo que o diagnostico clinico foi grippe sem que se saiba com segurança com qual está a verdade.

9 .—A dosagem da alexina é de grande valor para o prognostico porque quanto mais grave é o caso tanto mais baixo é o teôr alexico do sôro.

10 .—A diminuição do teôr do sôro corre por conta principalmente de uma baixa no teôr da fracção albumina da alexina (Endstuck).

11 .—Embora sem excluir a possibilidade de que a diminuição da alexina no sôro dos doentes seja devida a uma fixação da alexina sobre um complexo antigeno-anticorpo *in vivo*, opta-se pela hypothese de que seja sobretudo consequencia de uma perturbação funccional do figado de tal modo a baixa do teôr alexico se apresenta proporcional á gravidade de cada caso.

12 .—Embora coincida frequentemente na febre amarella a incoagulabilidade do sangue com a baixa do teôr alexico do sôro, os dois processos são independentes. No sôro de um caso fatal com forte baixa do teôr alexico encontrou-se um teôr normal em serosima. Confirma-se que a incoagulabilidade do sangue nessa molestia é devida sobretudo á presença de anti-thrombina (Vellard e Vianna).

13 .—Os constituintes thermolabeis da alexina não parecem apresentar nenhuma relação immediata com o constituinte albuminoide da thrombina.

———

Não devemos terminar sem expressar aqui o nosso reconhecimento ao professor Carlos Chagas e ao Dr. Carlos B. de Figueiredo pela efficaz assistencia e collaboração que prestaram a este trabalho.

Bibliographia

1. HAYDEN—citado por Goldner (5).
2. LESCHLY, 1916.—Zeitschr. f. Immunitätsf., vol. 25, p. 113.
3. LANGE, C., 1922.—Klin. Woch., vol. I, p. 1040.
4. BRINKMANN, 1922.—Centralbl. f. Bakt. orig., vol. 87, p. 50.
5. GOLDNER, M., 1929.—Deuts. Med. Woch., nº. 10, p. 390.
6. EHRLICH u. MORGENROTH, 1901.— Berl. klin. Woch., p. 250.
7. METTALNIKOFF, 1900.—Ann. de l' Inst. Pasteur.
8. LUDKE, 1905.—Münch. med. Woch., pp. 2065 e 2126.
9. BERGMANN u. KENTHE, 1904.—Zeitschr. f. exp. Path. und Therapie, p. 255.
10. BENTIVENGA e CARINI, 1900.—Le Sperimentale, vol. 54, p. 490, citado por Muller (14).
11. ABBOT u. BERGEY, 1902.—Centralbl. f. Bakt., vol. 32, p. 260.
12. SWEET, 1904.—Centralbl. f. Bakt., vol. 35, p. 259.
13. FASSIN, 1907.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 62, p. 617.
14. MULLER, 1911.—Centralbl. f. Bakt., vol. 57, p. 577.
15. NAGELSCHMIDT,—citado em Sacho: Handb. d. pathog. Mikroorganismen, vol. 2, 2a, pag. 866.
16. TROMSDORF, 1902.—Centralbl. f. Bakt., vol. 32, p. 439.
17. LUDKE, 1904.—Centralbl. f. Bakt., vol. 37, p. 418.
18. MORO u. POTPESCHNIG, 1908. — Wiener med. Woch., pp. 31, 95 e 139.
19. ABEN-ATHAR, 1907.—As oscillações do complemento do sôro dos pestosos e seu valor prognostico. These. Rio de Janeiro.
20. MEYER u. EMMERICH, 1908.—Münch. med. Woch., Ref., p. 1700.
21. MORO u. NODA, 1909.—Münch. med. Woch., p. 545.
22. SZIMAI, 1925.—Jahrb. f. Kinderheilk., vol. 109, p. 317.
23. VINCENT—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 81, p. 379.
24. KOCH u. SMITH—citado por Goldner (5).
25. HUNTEMULLER—idem. idem.
26. COSTA CRUZ, J. da, 1929.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 101, p. 948.
27. COSTA CRUZ, J. da, 1929.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 101, p. 954.
28. NOLF, 1900.—Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 295.
29. COSTA CRUZ, J. da, 1929.—Compt. Rend. de la Soc. de Biologie, vol. 102, p. 51.
30. FERRATA, 1907.—Berl. klin. Woch., vol. 44 p. 366.
31. DUNGERN—Münch. med. Woch., vol. 47, p. 677.
32. COCA, A., 1914.—Zeitsch. f. Immunitätsf., vol. 21, p. 604.
33. WHITEHEAD, GORDON and WORMALL, 1926.—Bioch. Journ., vol. 20, p. 1028.
34. BRAUN—Bioch. Zeitschr., vol. 31, p. 65.
35. SIMAM FELIX DA CUNHA, 1861.— Citado por P. F. da Costa Alvarenga. Anatomia, pathologia e symptomatologia da febre amarella, p. 137. Lisbôa.
36. MARCHOUX, SALIMBENI et SIMOND, 1903.—Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 665.
37. GABRITSCHEWSKY, 1896.— Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 630.

38. FROBISHER, 1929.—Proceed. of the Soc. f. Exp. Biol. and Med., vol. 26, p. 846.
39. NOLF—citado por Muller, loc. cit. p. 634.
40. LINS, S., 1929.—Arch. de Hyg. nº 1, p. 195.
41. OLSEN, O., 1922.—Biochem. Zeitschr., vol. 183, p. 24.
42. BORDET et DELANGE, 1912.—Ann. de l'Inst. Pasteur, vol 26, p. 744.
43. FUCHS, HARTMANN u. FALKENHAUSEN, 1929.—Zeitschr. f. die gesamt. exp. Med., vol. 64, p. 227.
44. BORDET, J., 1900.—Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 270.
45. VELLARD e VIANNA, 1929.—Suppl. das Memorias do Inst. Oswaldo Cruz, nº 7, p. 86.

The diagnostics of yellow fever by dosage of alexin (*)

by

J. da COSTA CRUZ

There has been up to a certain extent, some discrepancy between the results obtained by various investigators as to titration and up and downwards variation of alexin in the serum of normal individuals. However, Hayden (1), Leschly (2), Lange (3), Brinkmann (4), and Goldner (5) say the amount of alexin in such sera is most constant. In our opinion, the cause for such discrepancies may be ascribed, first of all, to existing in normal individuals, anti-complementary substances, such as those observed after a meal, provided with copious greasy food, in second place, to using for dosage a method not always uniform, and at last, to the fact of having for a moment lost of sight, that human alexin is extremely changeable, specially when diluted in saline solution.

For the time being, the hypothesis about plurality of the alexin is left aside; the opinion which prevails and is generally admitted by almost the whole of authors is that exposed by Bordet, who stated this substance, though complex, is but one and the same, with more or less capacity of adhesion to the most varied antigen-antibody complexes. Hence the result that any of such complexes may serve for a dosage of same, which, as a rule, is being done with the hemolytic complexes, these offering the possibility of an easier technique, a greater readiness and a very commodious reading of the results. It is absolutely necessary that these results may be compared with each other, the complex to be strictly the same, and to be used under equal conditions of adhesion for alexin.

Generally, the antigen to be applied to, has to be strongly sensibilized by an excess of the antibody, and should it be desired to determine within very narrow limits the lowest percentage of alexin is contained in a given serum, a reduced quantity of the antigen-antibody complex will have to be used, a quantity determined so as not to influence a safe determination of the results.

The importance of those considerations is fundamental for the dosage of alexin, since only in them resides the explanation of the enormous differences found by various authors. Besides, having to take into consideration the grade of sensibility of the antigen, owing to the variability of the quantities of normal hemolysin in human sera [1] this is of less importance than the quantity of antigen being sensibilized in the reaction. As a matter of fact, the same quantity of sensibilized globules, i. e. 1 cc. of the 2,5 % emulsion, in presence of 4 hemolyzing units or of 40, will give for the same fresh human serum, values sensibly equal to 0,07 and 0,06 cc., respectively, for the alexin. On the other hand, should the quantity of the sensibilized globules, be brought to the double, for instance, using the same volume

(*) Received for publication 16 January, 1930.

[1] We have found in our observations values which range from 5 to 160 units.

of globules at 2,5 % and globules at 5 %, both being sensibilized by the same relative quantity of hemolysins, that is to say, each of them with 40 hemolyzing units, we obtain for the same sera, values of the order 0,06 and 0,2 cc. respectively (total hemolysis). This shows clearly that the quantity of complement capable to determine the total hemolyse of any system is, up to a certain extent, in proportion with the quantity of sensibilized antigen [2].

As is to be expected, the percentage in the dosage is less variable when reading is made for partial instead of total hemolysis. In this case, as a fact, the titration in any of the instances we refer to, is more or less the same, and if only the absolute percentage of alexin is to be determined, this is the best method to be applied to. With this, however, other aspects of the dosage reaction are lost, which would be of a certain importance for the study of serum in patients with yellow fever, as, in the two diseased people we examined on the first day of illness, the change in the alexin was, we could say, much more in the quality than in the quantity: absence of total hemolysis with 0,1 cc. after 40 minutes; however a partial hemolysis with 0,06 cc. happened to appear after two hours, almost total, even with the latter dosis.

Discrepant being already the values got at with regard to the percentage of alexin, it must be expected that those referring to figures of the most varied diseases, be not less contradictory. For this reason, the dosage of the alexin was generally not in the least useful as a method for diagnosis.

Ehrlich and Morgenroth (6) observed a heavy decrease of the alexin in animals intoxicated with phosphorus, which results were confirmed by several investigators. Metalnikoff (7) and Ludke (8) observed this downfall of the alexin in chronic suppuration; Bergmann and Kenthe (9) described the fact of non arising hemolysis in uremia, pyemia, septicemia and carcinomatous diseases.

Bentivenga and Carini (10) got at an identical result in nutrition defficiencies; Abbot and Bergey (11) in poisoning with alcohol; Sweet (12) in experimental dia- and Fassin (13) and Muller (14) in thyroidectomy. According to Nagelschmidt (15), a decrease of the hemolytic power of sera is the result of a more action of cold. However, Tromsdorf (16) did not observe this, neither from the action of cold, hunger, fatigue, repeated bleedings, of poisoning by alcohol or opium, even when animals, weakened by these agents were about dying.

In pregnancy, the alexin is normal (Ledke (17). Moro and Potpeschnig (18) find it to be in increase in infectious diseases, such as typhoid fever, pneumonia and tuberculosis, and deem it an unfavourable prognosis for such illnesses when the contrary occurs. Aben-Athar (19) observed in bubonic plague, normal alexin, and only one or two days before the patient died, found a considerable decrease. In paroxystic hemoglobinuria, Meyer and Emmerich (20), Moro and Noda (21) observed missing of the complement. In scarlet fever, Szimai (22) found the alexin normal, or in increase, and only at the end of the first week, a slight decrease.

Vincent (23) states the disappearing of alexin caused by fatigue and Koch Smith (24) by hunger. Huntemuller (25) observed a decrease of alexin in athletes, after exhaustive sporting. Goldner (5) at last, finds a decrease of alexin in Basedow's disease, in pernicious anemia, in acute yellow atrophy of liver, in cirrhosis and in some cases of jaundice, and diabetes mollitus.

[2] Leschly. Zeitsch. f. Imm., vol. 24, pag. 499.

In uremia, on the other hand, he observed a serious increase of the alexin.

We are of the opinion that all the foregoing data need be not unreservedly admitted. The techniques applied to are of the most varied fashions; some authors are not quoted others do not effect the dosage of alexin, but merely search for the total hemolytic power of the serum. The most recent works generally insist upon the necessity of a good sensitization of the antigen. Nevertheless, none of them brought into consideration the quantity of the antigenic complex sensitized in the reaction, which is, as told hereabove, the most liable for the existing discrepancy, consequently of the highest importance, whenever comparable values are looked for.

In a communication read before the Sociedade Brasileira de Biologia on the 27th of February 1929 (26), we had called the attention to the considerable decrease of the alexin, which one observes in fresh serum of amarillic patients, between the 4th and the 7th day of the yellow fever, that is to say, during the period which follows the temperature stage [3]. Later on, thanks to the kindness and most friendly willingness of in and outdoors physicians of the Oswaldo Cruz Hospital, as well as of the Enfermaria de Isolamento of the São Sebastião Hospital, we have been enabled to realize numerous dosages of alexin, either in severe cases of yellow fever, or in mild and even weak cases, and in some only suspected instances, by which the medical diagnosis was unable to peremptorily determine the nature of the disease. The results obtained in all these instances were summarized and read before the Sociedade Brazileira de Biologia at its meeting on the 27th March 1929 (27). These are being now described with the necessary comments, in our present work.

Technique.—The method we followed was that based on the mere determination of the smallest available quantity of fresh serum from a patient, sufficient to determine complete hemolysis of an adequate hemolytic system. For an easier treatment, we made use of the hemolytic system generally applied to in Wassermann's reaction in nearly all laboratories, the system consisting of sheep's globules and anti-sheep rabbit serum. Considering that a high percentage of normal human sera show a variable quantity of sensitizer, hemolytic for sheep's globules, we took great care, in every instance, to use in the hemolytic system, a large excess of hemolysins, or say, 30 to 40 units dosed in presence of 0.1 cc. of fresh serum of guinea pig. All our calculations were made out of a volume of 4 cc. of the fluid. The globules were washed four times in saline solutions, of which the one which did the best service was the 2,5 % solution. Of this, 1 cc. was used, in each tube. The blood of the patients, gathered by bleeding of the vein at the elbow's bend, was immediately brought to the laboratory, in such a way, that in many cases it did not take more than one hour between the moment of bleeding and the dosage, which caution could not be neglected because of the extreme lability of the alexin. Samples of blood which did not readily coagulate, were brought into centrifugation tubes, when still fluid; as a rule, during centrifugation, the plasma coagulated and provided us easily with limpid serum. Being rather frequent this occurrence, and, with a view to spare patients'serum, the doses we used in the reaction, and which were by us deemed sufficient, have been 0.2 cc., 0.15 cc.,

[3] These observations have recently received a confirmation by L. Salles Gomes, Arch. de Hyg. 1929, n. 2, p. 155.

0.1 cc., 0.08 cc., 0.06 cc. and 0.04 cc. After placing these quantities into a series of tubes, we added hereto a saline solution in q. s. to make up 2 cc. Afterwards, we added 1 cc. of the solution with globules and further on, 1 cc. of hemolytic serum, previously dosed (30 to 40 units).

The tubes were then brought into a water-bath at 37°, and after some 30 to 40 minutes, the results were read. Generally, with such a system, normal serum produces total hemolysis with 0.06, some ones even with 0.04 cc. With a dose of 0.2 cc., hemolysis is effected in 3 to 5 minutes, and with only 0.1 cc. in about 10 minutes.

We never observed normal sera in which 0.08 cc. could not determine total hemolysis, and in none of the diseases we examined, including malaria (but for one case) did we fail to observe total hemolysis with 0.1 cc., exception being made for yellow fever. In this illness, even with 0.2 cc., many times, hemolysis does not occur, and even leave any trace. We consider as weakly positive for yellow fever, the reaction in which there is an hemolysis with 0.15, and hardly a partial hemolysis, or absence of the same with 0.1 cc. of the patient's serum; as positive, that which produces hemolysis, either partial or total, with 0.2 cc., and in which hemolysis is absent or hardly noticeable with 0.15 cc.; and strongly positive, reactions giving nó hemolysis with 0.2 cc. or showing hardly traces there of with the same dose.

In every instance in which we realized the dosage of alexin in patient's sera, we effected a counter-proof with an alexin dosage of a normal serum of a known percentage, in order to make sure of the efficiency of our hemolytic system. Very seldom, we have been compelled to verify the anti-complementary power of the serum at hand for examination, which anyhow, may be also very useful, since sera of patients with yellow fever, as we are to see further, possess no anti-alexic properties.

In pages 136-140 are tubulated the results we obtained for the dosage of the alexin in the various patients we examined, in using this technique and acting according to the criterium we have set up.

As may be seen from that list, in all instances which are clinically considered as of yellow fever, no total hemolysis could be observed with 0.1 cc. of fresh serum of the patient, excepting perhaps one single case in which the alexin percentage showed normal, i. e. of 0.06. The dosage was repeated on the following day, resulting in a confirmation of the fact. This case should therefore deserve a further thorough examination. Here is an abstract of the recorded observations:

P. F. N$_o$. 55.—Fell ill on March 3rd with headache, fever, weakness. During the night, clear vomiting. Entered Hospital on March 5th, showing slight epigastralgia with slight jaundice in the eyes. By that date, 60 cc. of horse-anti-amarillic serum prepared at the Instituto Oswaldo Cruz by Dr. H. Aragão were given to this patient. On the 6th, new ministration of a dose of 60 cc. of the same serum, subcutaneously. On the 7th, urine shows with albumin +++. Temperature was 40$_o$,2 on entering the Hospital. On the 7th, by which date, the dosage of alexin was effected, temperature was 38$_o$. On the 8th, on which the examination was repeated, 37$_o$. Was licensed, cured, on the 14th of March.

As is seen, this case is clinically the type of mild yellow fever, and has been considered as such in our former papers. It is a fact that albuminuria was of feeble intensity and appeared after some delay, which is alias of little mean-

ing for diagnosis, the patient having received during the foregoing two days 120 cc. of horse serum, which ipso facto, might be liable for occurring albuminuria. Nevertheless, it seemed to us that such injections of alien albumin, might have determined an increase of alexin in the patient's serum, thus transforming a reaction, expected to be weakly positive, into a negative, since, according to Nolf (28) and Muller, injections not only of blood plasma, but also of broth-aleurone, etc., ministered massively, may cause a transient increase of the alexin of the serum in laboratory animals.

We had however, a short time ago, the chance of finding in Dr. H. Aragão's laboratory, the serum of the same patient gathered two months after the disease, and after being kept for 6 months in the ice-box, and were able to verify its protective power in *Macacus rhesus*.

M. rhesus n. 52.—Inoculated subcutaneously, on 11. 28. 1929, with 2 cc. of serum from P. F. N. and on the 29th 11. 1929 with 0,5 cc. of infected blood from *rhesus* n. 48. It showed on 11. 29. 1929, 39°,5, on the 30th, 39°,2; on the 1. 12, 40°,7 on the 2nd 12, 40°,4, and on the 3rd December when about dying, 35°,4. Histopathological diagnosis: yellow fever.

M. rhesus n. 50.—Taken as a control for the foregoing, killed when with 37°,5 on the 3rd December 1929, was also with the same diagnosis of yellow fever.

It may be seen that this serum did prove no preventive action whatever against amarillic strain, since even the period of incubation was not in the least delayed.

One can thus be certain that in spite of clinical symptoms, the case of our patient *was not of yellow fever,* the more so that another serum from a convalescent, recovered from a mild attack of yellow fever, in which Dr. H. Aragão succeed in isolating the virus and infecting mosquitoes, though having been kept in the ice-box for about 18 months, protected in the safest possible way *Macacus rhesus* against infection.

M. rhesus n. 60.—Inoculated on the 12. 9. 29 with 2 cc. of the serum from the convalescent Novelli, and on the 10. 12. 1929 with 0,5 cc. of infecting blood from *M. rhesus* n. 55. Did not show rise of temperature until the 12. 23. 1929.

M. rhesus n. 62.—As control for the foregoing, inoculated on the 12. 10. 1929 with 0,5 cc. of blood from *rhesus* n. 55 showed 39°,5 on the 10th; 39°,5 on the 11th; 39°,6 on the 12th; 39°,2 on the 13th 39°,6 on the 14th. Same day, at night 40°,6 and on the 15th 41°. Was found dead on the 16th in the morning. Histological diagnosis: yellow fever.

P. F. N.'s case is, in our opinion, most instructive, for it enables us to affirm, at least with the highest grade of probable security, that a clinical diagnosis of yellow fever is not possible, in spite of all aspects, when the alexin dosage gives a negative result. As a matter of fact, in no case, but this, which was clinically recognized as yellow fever, did we fail to note the decrease of alexin in the serum, and the complete study of this sole case seems to prove that, as a rule, this illness never shows itself, but with this constant symptom.

In the cases in which the alexin reaction for yellow fever was negative and clinical diagnosis of other disease was effected with all accuracy, we have found an increase of alexin in one case of pneumonia, another of «flu» with pulmonar aspects on the first day of the illness, and one of hypertrophic cirrhosis (readily and completely hemolysed with 0,04 cc. of serum). In all others, the percentage was normal in whatever sex, i. e. 0.08 or 0.06 cc. In malarial incidences examined by us, we obtained a

	PATIENTS		REACTION'S RESULTS	CLINICAL DIAGNOSIS	OBSERVATIONS
1	A. M.	H. O. C.	Strongly positive	Severe yellow fever	Dosage effected on the 7th day of illness, 14. 2. 929.
2	D. M.	H. O. C.	Positive	Severe yellow fever	Dosage effected on the 6th day of ilness, 14. 2. 929.
3	R. M.	H. O. C.	Positive	Mild yellow fever	Dosage effected on the 4th day of illness, 14. 2. 929.
4	A.	H. O. C.	Negative	Normal indiv.	14. 2. 929.
5	A. S.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	Dosage effected on the 7th day of illness, 14. 2. 929.
6	A. S.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	Dosage effected on the 4th day of illness, 14. 2. 929.
7	N. F.	H. S. S.	Positive	Mild yellow fever	Dosage effected on the 8th day of illness, 14. 2. 929.
8	C. E. S.	H. S. S.	Negative	Convalescent from severe yellow fever	Dosage effected after 22 days without fever, 14. 2. 929.
9	G. S.	H. S. S.	Negative	Convalescent from severe yellow fever	Dosage effected after 14 days without fever, 14. 2. 929.
10	M. M.	H. O. C.	Negative	Malaria	Was febrile by the time he was bled, 19. 2. 929.
11	D. F.	H. O. C.	Negative	Malaria	Without fever by the time of being bled, 19. 2. 929.
12	O.	H. O. C.	Negative	Malaria	Without fever by the time of being bled, 19. 2. 929.
13	W. N.	H. S. S.	Negative	Convalescent from severe yellow fever	Dosage effected after 2 days without fever, 20. 2. 929.
14	A. P.	H. S. S.	Negative	Convalescent from severe yellow fever	Dosage dfected after 4 days without fever, 20. 2. 929.
15	L.	I. O. C.	Negative	Normal indiv.	20. 2. 929.
16	C. C.	I. O. C.	Negative	Normal indiv.	19. 2. 929.
17	A. D.	H. S. S.	Negative	Hypertrophic cirrhosis	Showed marked jaundice, and died 2 days later. 29. 2. 929.
18	A. M.	H. S. S.	Strongly positive	Yellow fever †	No information about high fever Died on the following day, 20. 1. 929.
19	T. S.	H. S. S.	Negative	Influenza	Had been for two days with fever 20. 2. 929.

20	C.	H. O. C.	Positive	Mild yellow fever	Dosage effected on the 6th day of illness. Apyretic. 24. 2. 928.
21	L.	H. O. C.	Strongly positive	Severe yellow fever	Dosage effected on the 6th day of illness. Was already without fever. 24. 2. 929.
22	E.	H. O. C.	Negative	Undetermined pyrexia	Had fever during one day. Had been four without fever. 24. 2. 929.
23	S.	I. O. C.	Negative	Normal indiv.	24. 2. 929.
24	E. C.	H. O. C.	Positive	Mild yellow fever	5th day of illness. Temp. 37°,8 25. 2. 929.
25	C. V.	I. O. C.	Negative	Normal indiv.	28. 2. 929.
26	A. C.	H. S. S.	Negative	Convalescent from severe yellow fever	Had fever. Apyretic by the time. 28. 2. 922.
27	H. F.	H. S. S.	Negative	No symptoms of yellow fever	3rd day of illness. Temp. 38°,2. 28. 2. 929.
28	M. C.	H. S. S.	Positive	Influenza	Since the day before without fever. 5th day of illness. 28. 2. 929.
29	J. J.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	On the day before 37°,8. By the time apyr. 28. 2. 929.
30	A. B.	H. S. S.	Negative	Influenza	4th day of illness. Temp. 37°,8. 28. 2. 929.
31	S. M.	H. S. S.	Weakly positive	Yellow fever	7th day of illness. Since 26/2 without fever. 28. 2. 929.
32	J. S.	H. S. S.	Strongly positive	Yellow fever †	3rd day of illness. Temp 39°,7
33	C. J.	H. S. S.	Negative	Malaria	Febrile. 28. 2. 929.
34	A. S.	H. S. S.	Strongly positive	Yellow fever †	6th day of illness. 28. 2. 929.
35	G.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever †	3rd or 3th day of illness. 2. 3. 929.
36	Dr. F. M.		Negative	Gravidic intoxication	2. 3. 929.
37	Dr. H. P.		Negative	Typh. fever	2. 3. 929.
38	D. M.	H. S. S.	Positive	Influenza	Ill during 24 hours. 2. 3. 920.
39	M. S.	H. O. C.	Negative	Undetermined pyrexia	2. 3. 929.
40	A. F.	H. O. C.	Positive	Yellow fever	3rd to 4th day of illness. 2. 3. 929.

(Continued)

PATIENTS			REACTION'S RESULTS	CLINICAL DIAGNOSIS	OBSERVATIONS
41	H. G.	H. S. S.	Positive	Influenza	4th day of illness. 2. 3. 929.
42	W. M.	H. S. S.	Negative	Convalescent from yellow fever	Apyretic since 3 days. 2. 3. 929.
43	I.	H. S. S.	Negative	Malaria	Since 2 days without fever. 2. 3. 929.
44	A. B.	H. S. S.	Negative	Undetermined pyrexia	Since 2 days without fever. 2. 3. 929.
45	M. C.	H. S. S.	Negative	Undetermined pyrexia	Since 7 days without fever. 2. 3. 929.
46	M. M.	H. O. C.	Negative	Malaria	Temp. 38o,4 by time of taking blood, 6. 3. 929.
47	G. F.	H. O. C.	Negative	Cirrhosis, ascitis, chronic malaria	Temp. 37o,2 by time of taking blood. 6. 3. 929.
48	J. F.	H. O. C.	Negative	Chronic infection febrile	Temp. 37o,4 by time of taking blood. 6. 3. 929.
49	C. M.	H. O. C.	Negative	Since 15 days convalescent from yellow fever	Temp. 36o by time of taking blood. 6. 3. 929.
50	A. M.	H. O. C.	Negative	Pulmonar tuberculosis	Temp. 38o by time of taking blood. 6. 3. 929.
51	S. V.		Strongly positive	Malaria	2nd day of illness. Temp. 38o,5. 6. 3. 929.
52	A. Z.	H. O. C.	Positive	Yellow fever	6th day of illness. 6. 3. 929.
53	A. F.	H. O. C.	Positive	Yellow fever	4th day of illness. 6. 3. 929.
54	M. G.	H. S. S.	Strongly positive	Yellow fever †	3rd day of illness. 7. 3. 929.
55	P. F.	H. S. S.	Negative	Yellow fever	4th day of illness. 7. 3. 929.
56	J. B.	H. S. S.	Negative	Influenza	2nd day of illness. 7. 3. 929.
57	A. G.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	6th day of illness. 7. 3. 929.
58	F. O.	H. S. S.	Negative	Malaria (anatomic diagnosis, 9. 3)	Unconscious, Temp. 38o,6. Died 2 days later. 7. 3. 929.
59	L. R.	H. S. S.	Positive	Yellow fewer	5th day of illness. Temp. 38o. 7. 3. 929.
60	O. O.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	6th day of illness. Temp. 37o,5. 7. 3. 929.

61	A. S.	H. S. S.	Negative	Parotiditis. Convalescent from yellow fever	7. 3. 929.
62	A. R.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever †	3rd day of illness. 9. 3. 929.
63	J. A.	H. S. S.	Strongly positive	Yellow fever †	3rd day of illness. 9. 3. 929.
64	J. K.		Strongly positive	Influenza	2nd day of illness. 9. 3. 929.
65	A. J.	H. S. S.	Negative	Pneumonia	3rd day of illeness. 9. 3. 929.
66	A. P.	H. S. S.	Negative	Undetermined pyrexia	5th day of illness. Temp. 39o. 9. 3. 929.
67	D. C.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	5th day of illness. 9. 3. 929.
68	J. S.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	3rd day of illness, 13. 3. 929.
69	E. P.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	5th day of illness. 13. 3. 929.
70	L. D.	H. S. S.	Negative	Normal individ.	13. 3. 929.
71	C. A.	H. O. C.	Positive	Yellow fever	4th day of illness. Temp. 38o. 13. 3. 929.
72	A. G.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever †	4th day of illness. Renal form. Tem. 37o,2 15. 3. 29.
73	A. S.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever	12th day of illness. Had been 3 days without fever. 15. 3. 929.
74	A. A. H.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever †	4th day of illness. Temp. 38o. 16. 3. 929.
75	M. G.	H. O. C.	Negative	Pulmonar tuberculosis	Temp. 37o. 15. 3. 929.
76	W. R.	H. O. C.	Negative	Pleurisy	Temp. 37o,8. 15. 3. 929.
77	J. A.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	2nd day of illness. 2. 3. 929.
78	S. C.	H. S. S.	Negative	Measles	8th day of illness. Temp. 38o,2.
79	J. A.	H. S. S.	Negative	Catarrhal jaundice	Temp. 39o,5. 16. 3. 929.
80	J. F.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	4th day of illness. Temp. 37o,8. 16. 3. 929.
81	S. S.	H. S. S.	Negative	Influenza	2nd day of illness. Temp. 38o,4. 16. 3. 929.
82	J. S.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	6th day of illness. 16. 3. 929.
83	F. G.	H. S. S.		Yellow fever †	4th day of illness. Temp. 39o,5. 16. 3. 929.

(Continued)

PATIENTS			REACTION'S RESULTS	CLINICAL DIAGNOSIS	OBSERVATIONS
84	A. P.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	5th day of illness. Temp. 36º,5. 16. 3. 929.
85	C. K.	H. S. S.	Weakly positive	Influenza	3rd day of illness. Temp. 48º. 16. 2. 929.
86	M. J.	H. O. C.	Negative	Undetermined pyrexia	Had been 2 days without fever. 18. 5. 929.
87	J. C.	H. O. C.	Negative	Cerebrospinal meningitis	3rd day of illness. 18. 3. 929.
88	M. G.	H. O. C.	Negative	Not a case of yellow fever	
89	A. B.	H. O. C.		Undetermined pyrexia	3rd day of illness. 18. 3. 929.
90	C. C.		Negative	Normal indiv.	18. 3. 929.
91	J. C. G.	H. S. S.	Strongly positive	Yellow fever †	3rd day of illness. 19. 3. 929.
92	A. G.	H. S. S.	Strongly positive	Yellow fever †	2nd day of illness. 19. 3. 929.
93	C. P.	H. S. S.	Positive	Yellow fever	5th day of illness. Apyretic. 19. 3. 929.
94	A. B.	H. S. S.	Weakly positive	Yellow fever	3rd day of illness. Temp 39º. 19. 3. 929.
95	F. P.	H. O. C.	Weakly positive	Yellow fever	3rd day of illness. Temp. 39º,5. 19. 3. 929.
96	P. N.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever †	5th day of illness. 19. 3. 929.
97	J. F.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever †	4th day of illness. 19. 3. 929.
98	B. S.	H. O. C.	Negative	Malaria	22. 3. 929.
99	G.	H. O. C.	Negative	Not a case of yellow fever	22. 3. 929.
100	C. C.	H. O. C.	Negative	Not a case of yellow fever	22. 3. 929.
101	J. F.	H. O. C.	Negative	Not a case of yellow fever	22. 3. 929.
102	A. G.	H. O. C	Strongly positive	Yellow fever †	22. 3.929.
103	M. F.	H. O. C.	Strongly positive	Yellow fever †	22. 3. 929.

total hemolysis with 0.1 cc., but in 3 cases with 0.008 cc. the hemolysis was not total. One single case of a patient gave a total hemolysis with 0.15, and hardly partial with 0.1 cc.. This case was of a man, 60 years old, scotch, nº 51 of the preceding list, who was at the beginning of infestation by the plasmodium of mild tertian malaria. Notwithstanding many authors having observed a decrease of alexin in paludism, we believe the examination of this case proves hardly hepatic insufficiency.

Among the 103 cases stated in our list, in 5 more cases, besides the one we just mentioned, the dosage of the alexin gave a positive result for yellow fever and the clinical diagnosis was uncertain, or rather, by lack of more accurate symptoms, it was considered as influenza without pulmonar accidents; the cases are those numbered 28—38—41—64 and 85. All gave positive or weakly positive reactions, and were cases that showed at times slight albuminuria, at other times, slight jaundice, with or without epigastralgia, but all of them evolved toward a cure, so we were unable to verify in their sera the protecting power in laboratory by want of the means to do so. As a whole, in the 103 cases we examined, it was verified that in one case, the reaction was negative, and the clinical diagnosis positive, this latter being wrong; in another, the reaction was positive and the clinical diagnosis, negative which in this occurrence was accurate and quite exact [4].

In five more cases, the reaction was positive, and the clinical diagnosis uncertain without any one being able to decide who is right or not.

Beside these, there are some cases, in which clinical diagnosis was impossible and the reaction was negative as far as yellow fever is concerned.

Obeying to our principle of prudence and to a feeling of absolute fairness, we are led to believe that some of these cases, in spite of the many examinations, may have been of yellow fever, which was impossible to make sure, and even could have been ascertained with difficulty by way of experiment.

One thing certain is, if we may trust our own observations, that neither the «flu» when incipient, nor pneumonia, nor measles, nor typhoid fever can be mistaken, when dosing the alexin, with yellow fever. I must state the same about malaria, should I wish to draw any conclusion from the following observations:

F. O. Nº. 51.—Brazilian, apparently 20 years. Was admitted on March 5th suspect of having got yellow fever, with high temperature and in unconscious condition. We could not get any information. On the 7th, was bled with a view to effect the dosage of alexin, the same existing in the serum at the rate of 0,06. Died on the 9th March. Anatomic diagnosis: paludism.

D. O. of the staff of the Instituto Oswaldo Cruz.—Yellow fever suspected. Suffers from chronic nephritis. Fever, dark vomiting; on the 4th day, dosage of alexin negative, effected in view of detecting yellow fever. Clinical diagnosis: malaria (mild tertian).

In every case when we were offered a chance of examining some patient which could offer interest for the dosage of alexin, we never failed to avail ourselselves thereof, which enables us to add some curious and instructive observations, in view of the criterium to be adopted when dealing with diagnosis about yellow fever by dosage of alexin.

[4] By kind information of Dr. Soper, we have been aware that the serum of this patient, examined later in the laboratories of the Rockefeller's Institute, proved unfit for protecting *M. rhesus* against infection by yellow fever.

1. J. F. Admitted at the H. O. C. as suspect of yellow fever. Symptoms: albumin, marked jaundice. Has fever. Had vomiting. The clinical picture is similar to that of severe yellow fever, to such an extent that the respective diagnosis is made with all certainty. The alexin gave a total and quick hemolysis with 0,2 and 0,15 cc. and almost total vith 0,1 cc. The reaction was very weakly positive, rather dubious, considering the schematic criterium followed by us from the beginning.

In all cases of the same severeness, we always met with a much higher decrease of alexin, that is to say, absence of hemolysis with 0.2 cc. So that we do not the least hesitate to give this reaction as a negative result, which result caused all physicians to be surprised. Two days later, this patient died with the clinical diagnosis of yellow fever, however the histo-pathologic examination cancelled completely this diagnosis. It seems to have been rather a case of hemolytic jaundice, which was impossible to make sure, owing to the fact of the dosage of globular resistence not having been made in vivo.

2. G. A. of H. C. E. In the course of an antisyphilitic treatment (oxycyanide of mercury), is admitted in the infirmary with a very marked jaundice, vomiting, without showing any fever. When effecting the dosage of alexin, a complete absence of hemolysis was verified with 0,1 cc. of the fresh serum.

The patient died on the following day and some viscera brought to this Institute for study. The histo-pathological examination of the liver resulted in diagnosing an acute yellow atrophy of this organ.

Thus, the acute yellow atrophy of liver, which disease is such an uncommon one, that this case is the first recorded among 6000 autopsied realized at the Institute Oswaldo Cruz, and its symptomatology is of such similitude with that of yellow fever, that french authors (Dieulafoy) found a name for it: «fièvre jaune nostras», does not present a dosage of alexin different from yellow fever, at least during the last stages of the illness, the day before death occurs.

I must add nevertheless, that in one case of sub-acute atrophy of liver (according to clinical diagnosis) the dosage of alexin proved a normal rate, that is to say, 0,06 cc. on the 3rd day of the illness, in a patient we examined at the Enfermaria de Isolamento of the São Sebastião.

3. A brazilian woman, 87 years. Two years ago, a diagnosis effected proved to be a case of pernicious anemia. She applies since that time to Whippe's treatment, which was of splendid service to her. By the time of our examination, 3 months ago, she did not more use the treatment, and showed with 1.800,000 globules per mm^3. The dosage of the alexin reveals a quick and total hemolysis with 0,04 cc. She undertakes again the treatment, and, one month later, shows with 3,000,000 globules per mm^3.

Thus, in spite of an advanced age and an old pernicious anemia, the percentage of alexin was normal.

4. C. V. Brazilian, man. Old and severe hookworm disease. 900,000 globules per mm^3. Percentage of the alexin, 0,06 cc. with 0,04, almost total hemolysis in 30 minutes.

5 and 6.—Atrophic cirrhosis. One of these patients, woman, 45 years old, died one month after our examination of her serum. Both had given a quick and total hemolysis with 0,06 cc., whereby the percentage of alexin was perfectly normal.

The same occurred in a case of hydatic cyst of the liver, and in another of wide carcinoma of the same organ. From the foregoing observations we may conclude that in the case of the hepatic le-

sions beeing limited, though intensive and the liver maintaining integral cellular elements, which elements are, in general sufficient for giving to the serum a normal amount of alexin.

Summarizing the analysis of this report, it seems reasonable to conclude to the fact that the method of dosing alexin for the diagnosis of yellow fever, if probably not of absolute value (acute atrophy, malaria ?), is of a very high importance and the best of all those which physicians, up to now, may rely upon.

As a matter of fact, in febrile diseases, which, when incipient, show a tendency to be mistaken for yellow fever, we see no decrease in the percentage of alexin in the serum but even on the contrary many times, there is an increase. In malaria, in most of the cases, the defficiency of alexin if any, is but little and does not interfere in the least in the results, as far as yellow fever is concerned. However we ought not to forget, that on approaching of the death, the most varied maladies (such as, for instance, bubonic plague) may have as a result a marked downfall of the alexin percentage. These are, in fact, cases which offer no difficulty whatever to physicians. The reaction is valuable only during the first stage of the illness; as may be seen from the above list, it disappears readily in convalescents, being then of no use in the case of a retrospective diagnosis.

Under the epidemiologic point of view, one may consider the possibility of existing very mild instances, which may not be detected, either by clinic diagnoses or by diagnosis based on the dosage of alexin, as we do not dispose upon elements to put apart such possibility, however we may have obtained positive reactions in two mild cases, on the first day of the illness, one of which evolved further in a perfectly typical way, and had been examined only after 6 hours of fever.

On examining, even not detailedly, our report of the cases we exposed hereabove, a very clear notion derives readily, which we did not immediately cared for: that of the regularity with which the decrease of alexin in yellow fever is in relationship with the severeness of the case.

As a matter of fact, all mild cases, without exception, gave a complete hemolyse with 0,2 cc., complete or almost complete hemolyse with 0,15 cc., and absence of hemolyse or at times traces of hemolyse with 0,1 cc. of serum. In severe incidences, on the contrary, the decrease of the alexin has always been deeper. Let us consequently try to turn our mind to the practical appliance which could be likely to result from this fact, as far as prognosis is considered. We verified, that, as a rule, all the cases in which with 0,2 cc., hemolyse failed completely to appear, have been fatal cases, and this, not only in yellow fever as in acute yellow atrophy of liver. On the second day of the illness, if there is only a partial hemolyse with 0.2 cc, and a complete lack of same with 0.15 cc., the prognosis is likewise a bad one.

Our own conviction is that, a certain low grade of alexin being reached to, its percentage is unfit to keep life, which means that the alexin plays physiologically a first class part in the principle of life or it may be produced by an organ whose function is essential and whose activity may be possibly controlled by the percentage of alexin in the serum.

In morbid cases, in which such a marked decreease is being observed, this is a sign which appears when other symptoms already present are forecasting a very near fatal end (exhaustion, pancreatic diabetes, bubonic plague, etc.). In yellow fever, on the contrary, this sign appears early on the 2nd day of illness, in patients who seem apparently but mildly attacked, and in whom no-

thing may suspect a fatal end, which occurs unexpectedly. On the contrary, the cases in which, on the 3rd or 4th day of illness, the total hemolyse with 0.15 cc., and the lack or only traces of same with 0.1 cc. is observed, are cases which will evolve as mild ones, although they would appear, by other symptoms (high fever, agitation, hemorrhages), as clinically very severe forms.

The mere objective perusal of the observations we have exposed, enables us to affirm, without any doubt, *that the dosage of alexin is an element of the most surprising accuracy for the prognosis of yellow fever.*

——

Having verified, immediately after examination of our first cases, that the serum of amarillic patients does not show any anti-alexic properties, neither for the alexin of guinea pigs nor for human alexin, it seemed to us reasonable to admit that the decrease of alexin was due less to an exaggerated destructive process of this substance, in the serum, than to a change in the process of its production by the organism. We directed then our researches in this way, and from the obtained results this hypothesis of ours seems to receive a confirmation. These results have been read before the Sociedade Brasileira de Biologia, at its May ult. meeting (29).

The alexic property of sera is not, as is known, the result of the activity of a simple substance, but of a complex of substances, some ones thermo-labiles, others heat-fast, which always exist in normal sera. In fact, in 1907, Ferrata (30) was the first to find out and demonstrate that this property is only exertible by concomittance of two thermo-labile substances, which may be separated by dialysis, since one of them possesses the physico-chemical properties of globulins, and consequently precipitate when treated in this way, the other with the properties of albumins remains soluble. Later on, Von Dungern (31) discovered an anti-complementary property, which, as Coca (32) verified, exerted itself on another substance; this heat-fast one, when dialyzed, accompanies, as a rule, the globulin part of sera, and is also indispensable for the alexin to manifest its properties. It may be separated from the other two of Ferrata, being in fact energetically absorbed by yeasts. In sera, which have been turned inactive by this method, it is possible to revigorate the alexic property by simply adding inactive serum. More recently, Whitehead, Gordon and Wormall (33), continuing Von Dungern's study about this factor, recognized the necessity of a fourth substance, also thermo-resistent, for the alexin to exert its activity. It is an element, which, in dialysis accompanies Ferrata's albumin fraction, and which, is, besides, differenciated from V. Dungern's by the fact of the sera, whereform it is extracted through the action of small quantities of ammonia, being able to reacquire the alexic activity by mere addition of inactive serum, freed from the V. Dungern's thermo-resistent factor.

Our researches in this way were effected in the serum of two patients only, since, by the time, the incidences of yellow fever had become rather scarce. The results, however, have been the same in both cases, and we believe we may consider them as reliable. We give herebelow a transcription of the process of both analysis, such as they were at first submitted to the Sociedade de Biologia.

1 .—Serum of a patient with yellow fever, of medium strength, obtained on the 4th day of the illness. The dosage of alexin gave a total hemolysis with 0,2 cc. almost total with 0,15; completely failing with 0,1 cc. The addition of inac-

tivated serum, either of man or of guinea pig does not enable to get traces of hemolysis with 0,1 cc. of the patient's serum, which readily proves that the lack of the thermo-resistent elements in the patient's serum is not exclusively liable for the want of alexic activity at such a dose. For its part, the Ferrata's globulin fraction, being added at the rate of 1 cc. to each tube (representing the quantity contained in 0,1 cc. of pure serum) does not in the least alter the alexic titration in the patient's serum; on the contrary, adding 1 cc. of the Ferrata's albumin fraction allowed to observe a total hemolysis of the hemolytic system in use, always the same, even up to a dose of 0,005 cc. of the patient's serum.

The second serum we examined for this purpose was of a patient with 4 days illness, who died 2 days later. When dosing alexin, no trace whatever of hemolysis could be gathered with 0,2 cc. Like in the previous case, the alexic percentage in serum did not suffer any alteration, neither by adding serum of man or guinea pig, recently inactivated, nor by joining the Ferrata's globulin fraction. The albumin fraction being added, determined on the contrary, a total hemolysis up to a dose of 0,04 cc. of the patient's serum. One must take into consideration that, in these experiments, the separation of the Ferrata's fraction was thoroughly made, and the albumin part, even at a rate of twice that we used, i. e. a dose of 2 cc. was unable, isolatedly, to even produce traces of hemolysis with our hemolytic system.

The technique we applied to, for isolating both fractions was Liefmann's modified by Braun (34) which was carried out as follows:

Dilute the fresh serum at the rate of 1/10 with very cool distilled water. Allow a stream of carbonic acid to pass during 10 to 15 minutes through the fluid which must be kept cold during the whole operation. The strongly turpid fluid which is obtained by precipitation of the globulins is then centrifugated for 5 minutes at a speed of 3500 rotations. The overswimming part of the fluid, which contains 10 cc. of the albumin fraction, at a 1/10 dilution, is added to 1 cc. of an 8,5 % sodium chloride solution; so as to reconstitute the isotonicity, then, freed from carbonic acid by stirring and repeated passages from one to other tube. This fraction must be kept immersed within a recipient containing very cold water. The deposit resulting from centrifugation, is then washed twice consecutively with cold distilled water, and further dissolved into a saline solution. With this method, we have always successfully obtained, not only a full and easy separation, but also perfectly active fractions, as well with human alexin as with guinea pig's, both used in the mentioned experiments with sera of two patients.

In a word, in the serum of amarillic patients, the thermo-resistent elements as well as the thermo-labile globulin fraction of the alexin, exist in appreciable quantity, though a sensible difference has been observed between the sera of both patients we examined; the absence of hemolysis, depends principally lack of the albumin fraction.

In presence of such results, we have been induced to investigate about the percentage of the globulin fraction in normal sera. In two sera, showing an alexic tenor of 0,06 cc., we observed total hemolysis with 0.01 cc., when adding the albumin fraction, which demonstrates that, also in normal individuals, there exists a greater quantity of the globulin fraction of the alexin than of the albumin fraction, and that, when dosing alexin in the usual way, the percentage of the dosage is but in accor-

dance with the quantity of the albumin fraction existing in such sera.

——

When one tries to investigate the process and the cause of the alexin regression in the serum of amarillic patients, various hypothesis occur to the mind, such as: fixation *in vivo* of the alexin upon an antibody antigen complex; in view of the indiscussible part the liver plays as the organ productor of alexin, binding the observed defficiency of the alexin with hepatic insufficiency; ascribing the changes in blood coagulability, as observed in yellow fever a long time ago (S. F. da Cunha (35) 1723), the alteration of alexin, admitting at first the hypothesis that alexin plays its own part in the coagulation process, or is being formed during this.

Various observations, realized in 1903 by the French Commission, whose members were Marchoux, Salimbeni and Simond (36) would be rather a support to the first of these hypothesis. From these, it seems to appear that early during the first days of the disease, when the blood is surely infectant, there exists in the patient's serum, some preventive property, i. e. the infecting strain together in the circulation with its specific antibody. Now, all authors unanimously admit not only the possibility of sensitization of the antigen *in vivo,* such as Gabritschewsky (37) demonstrated so clearly to exist in recurrent spirochaetosis, as also, a fact, that is also plainly confirmed by many investigators, that the direct introduction of sensitized antigens into the circulation of laboratory animals, brings immediately as a result, a decrease of the alexic tenor in these animals, which is the same as saying that on theses complexes, as well *in vitro* as *in vivo,* the alexin is absorbed.

In our opinion, one cannot exclude, then, the interference of this process as the responsible factor, at least for a part, for the defficiency of alexin, moreover since recently Frobisher (38) seems to have succeeded in realizing the reaction of fixation of the alexin *in vitro* in yellow fever.

Other factor would also support this possibility.

In human yellow fever, the decrease of alexin occurs early, and as may be seen from the exposed list, we may already observe this, at times, in the first 24 hours of the illness. One may reluctantly admit that during this short period, the decrease be the fact of an anatomic change in liver, and it seems more reasonable to suppose, that, at least, during this first stage, this decrease is bound with the fixation of the alexin *in vivo* upon an antigen antibody complex. On the other hand, in *Macacus rhesus,* during the first two days of fever, (whenever no hypothermic stage occurs before), no decrease of alexin is to be observed, or if any, only inconstant. Yellow fever, in these animals, is the exact reproduction of the disease in man, the only difference being that in animals the reaction is more precary, the formation of antibodies slower as is shown by the long permanency of the virus in the blood, and above all, the infectiousness of viscera post mortem, so that the most severe intoxication, though almost always fatal, does not leave time for the phenomena of incoagulability of blood to be detected, except, when death does not occur immediately, and the animal in hypothermy, resists for a long time [5].

[5] At times, in *rhesus,* the blood behaves itself in a very similar manner as man's. Here is an example: *Rhesus 67*; 0,01 cc., total hemolysis, 0,06 almost total hemolysis; 0,04 absence of hemolysis. After inoculation of amarilic strain (infected mosquitoes) shows after 4 days in the moring, 41° fever. Dosage of alexin: 0,1cc total; 0,08 almost total; 0,04 hemolysis fails completely. On the following day, temperature 40°,5. Dosage of alexin: 0,2 cc total hemolysis; 0,15 cc, partial hemolysis; 0,01 cc. absence of hemolysis One day later, temperature 39°,9 the blood does almost not coagulate. Absence of hemolysis with 0,2 cc.

In such case, the blood remains fluid during a long time and coagulate slowly in cottonlike flocks and, like in man, after the 4th day of illness, leaving a serum in which a deep fall of the alexin is observed (at times, absence of hemolysis with 0,8 cc. of pure serum).

Consequently, we believe that, between the precocity of the decrease of alexin and the earliness of formation of antibodies in yellow fever in man, as well as, together with this, the lack of both phenomena in yellow fever in *rhesus*, there ought to exist a narrow relationship which does not appear to us as a mere coincidence. In accordance with these considerations, we are of the opinion that, during that period, the decrease of the alexin may be accounted for by a specific reaction in the patient's serum, and contributes to determine further on the phenomena of anaphylactic shock (Sinvals Lins, 40) which appear with the temperature crisis (leucopenia, fall of arterial pressure, incoagulability of blood, removeable, like that of pepton plasma by thromboplastic agents, almost complete disappearance of the alexin, hypothermy, etc.

The part played by liver as an essential organ for the production of the alexin, has been plainly made obvious by Nolf (39) in a way, that leaves no place for any discussion. Muller (14) some time afterwards, in a valuable work, did not only support Nolf's theory as also did he even succeed in obtaining a production of alexin from isolated animal livers, which were maintained alive by artificial circulation. Well, then, in yellow fever, the liver is always hurt and the lesions extend themselves, at times, to the whole hepatic parenchyma.

It can thus not be admitted that, this being the case, a strong hepatic insufficiency be not present in yellow fever. It is true that Lins (40) came to quite contrary results, submitting various patients to the tests of levulosuria and galactosuria. The fact that, at the beginning of convalescence from mild cases, Lins finds with these tests a marked hepatic insufficiency in the same patient, who, during the first stage of the illness, gave a negative result, induces us to believe that hepatic insufficiency in yellow fever is in fact considerable, and that these tests of hepatic exploration in yellow fever are not practicable in view of the gastro-intestinal intolerance of patients.

The same renal lesions which, at times, are an immediate cause of the death, are probably the result of a general intoxication owing to defficiency of the hepatic function, as is also probably the case in acute yellow atrophy of liver.

As we see hereabove, in yellow fever, what first disappears from the alexin, is but its albumin fraction; for, if Muller's works allow to verify that no organ but the liver, is capable to create alexin, Olsen's show that, while various organs like liver and spleen can supply the globulin fraction, it is only the liver which produces the albumin fraction. There remains thus, for us, not the least doubt that the decrease of alexin in yellow fever, at least after the crisis which S. Lins so cleverly assimilated to the anaphylactic shock, is a reflex of the functional weakness of the liver. We deem it even possible that, since the first stage of the disease, together with a specific fixation *in vivo*, the condition of the functional inability in which the organ may already find itself, also contributes to a diminution of the alexin, and if, as we affirm hereabove and keep in our own conviction, the dosage of the alexin is of a high value for the prognosis of yellow fever, we are compelled to admit that *the pathology of the illness is limited exclusively to this organ, and*

that the death of patients is exclusively the result of hepatic failure.

——

The idea that the alexic amount of serum is dependent upon the process of blood coagulation, has been emitted by Metchnikoff. Nevertheless, this author's opinion, according to which alexin starts from leucocytes, came to a failure, however reluctantly, and not without many work having been written by the numerous investigators. Not only in plasmas obtained in paraffined tubes, as also by the addition of oxalates and citrates, but even in plasmas obtained within the vessels, to prevent any beginning of coagulation, the amount of alexin is sensibly the same. So that the question, as regards these particulars, is nowadays fully solved. However, if this idea has been left aside, the relationship which might possibly exist between the blood coagulation and the alexin remains still a controverted question.

Since the year 1908, Bordet and Delange (42) prove to have been struck by the similitude of physicochemical properties between the alexin and the albuminoid component of thrombin, but they claim against any identity. Recently Fuchs, Hartmann and Falkenhausen (43) in numerous papers, come back to the subject and feel inclined to conclude from their experiments that the alexin or one of its components, the globulin fraction (Mittelstueck) is the albuminoid component of thrombin (thrombogen of Morawitz, serosim of Bordet and Delange, plasmosin of Fuld and Spiro).

We also do enter in this particular, since it appeared to us that the blood of amarillic patients could probably bring a useful contribution to making this point clear. From our own experiments, it seems to us reasonable to conclude that, as a matter of fact, neither the globulin fraction nor the albumin part should represent the said serosim. In fact, we always obtained identical results in the following experiments.

In a series of five tubes, 0,5 cc. of rabbit plasma oxalated at 1 to thousand and treated by tricalcic phosphate, i. e. free from serosim are poured. To the first tube are consecutively added: 1 cc. of saline solution and 2,5 cc. of a calcium chloride solution chloride (77 parts of saline solution and 23 of a calcium solution at 1 %).

The second tube receives 1 cc. of the globulin fraction of the alexin, obtained by the mentioned Liefmann's process improved by Braun from fresh plasma of guinea pig oxalated at 1 to thousand, and centrifugated for two hours at 3,500 R/m plus 2,5 cc. of calcium solution. The third tube will contain 1 cc. of the albumin fraction of the same, oxalated plasma of a guinea pig. plus 2,5 cc. of calcium solution. The fourth to receive 0,5 cc. of the globuline fraction, 0,5 cc. of the albumin fraction and 2,5 cc. of the calcium solution.

Results: in the third tube, coagulation in 25 minutes; in the fourth, coagulation in 30 minutes.

The two first tubes remain fluid, even after 24 hours.

It is then obvious the globuline fraction of oxalated guinea pig's plasma does not contain the serosim which totally remains in the albumin fraction.

With a view to verify whether there was in the albumin fraction not serosim, but thrombin already in formation, we performed the following experiment.

Into a series of five tubes were poured 0,5 cc. of oxalated 1 to thousand guinea pig plasma. To the first, 1 cc. of saline solution was added; to the second, 1 cc. of the globuline fraction, to the third 1 cc. of the albumin fraction; and to the fourth 0,1 cc. of fresh guinea pig serum.

Result: coagulation visible in the fourth tube after 12 minutes. In the other

three, there was no coagulation, even after six hours [6].

In all experiments about separation of the alexin elements, controls were established to show that this separation was thoroughly effected, and that both kept their activity, that is to say, one could verify that, when added to sensitized globules of sheep, none of them separately, even at the rate of 2 cc., showde traces of hemolysis, whereas if added at the rate of 1 cc. for each of them to the same sensitized globules, the hemolysis was total after 15 to 20 minutes. The results being consequently that if any of the fractions of the complement should be one of the components of thrombin, the albumin fraction only can fulfil this part.

It is known that the process of specific hemolysis determined by the albumin fraction on the alexin, probably consists of a coagulation of the stroma in globules as seems to result from some of Bordet's observation (42). The hypothesis that such substance determines also the coagulation of the fibrinogen should be very attractive. Meantime, an already old experiment of Bordet and Delange (42) contradicts this supposition, in fact if from a serum richly supplied with serosim, the alexin is extracted by means of sensitized globules, the fluid still shows the presence of serosim and is able to form thrombin by addition of cytozym.

We repeated this experiment with a view to verify whether admitting the albumin fraction and the serozym to be the same substance, the serozym presents itself in lower percentage than the albumin fraction in hemolysis. Such is not the case.

If one disposes of an oxalated guinea pig plasma, able to hemolyze at the rate of 0,02 and to provoke coagulation of the phosphated plasma at the rate of 0,01 cc., and if to such plasma, one adds sensitized globules in excess, and after one hour's stay in the dry oven at 37°, undertakes centrifugation, one sees that even a dose of 0,1 cc. of this fluid is unable to determine hemolysis of hypersensitized globules (globules, plus sensitizer, plus globulin fraction of the alexin) though at a dose of 0,01 cc., it still continues to produce coagulation of recalcified phosphated plasma.

The study of the serum of amarillic patients leads to the same conclusion. Owing to the scarcity of cases, we could only carry out the examination of a serum with that purpose. This serum, at a dose of 0,2 cc., did not give even traces of hemolysis with the hemolytic system generally in use for our experiments, but with the addition of the albumin fraction of the alexin of guinea pig, it was active up to a dose of 0,04 cc.. The serosym of this serum was easily revealed in recalcified phosphated plasma of rabbit, even with 0,01 cc., a dose which we found in two other sera of normal individuals.

It is a well known fact that the incoagulability of blood in yellow fever, is mostly ascribed to the existence of anti-thrombin as has been demonstrated by Vellard and Vianna (45) which we besides had an opportunity to observe.

From our own experiments, as has just been exposed, a conclusion may be drawn, that the albuminoid component of the thrombin, may keep a normal percentage in a serum that shows a deep lowering of the alexin, as well in relation to the albumin as to the globulin fraction.

It seems then that these obervations

[6] We must add that, however durable the centrifugation of the guinea pig plasma could be, the slow formation of thrombin in the albumin fraction could not be prevented. There remains in it also a small amount fibrinogen; so that, from one to another day, a slight of coagulum fibrinogen may appear.

are completely against the hypothesis of the complement's constituting elements playing any part in the formation of thrombin, and consequently that the process of decrease of the alexin shows no immediate correlation with the changes in coagulability of the blood in yellow fever.

CONCLUSIONS

1 .—The importance of the absolute quantity of sensitized globules in the dosage of the alexin, is primordial, whenever values are searched for, which may compare with other by simple observation of the total hemolysis.

2 .—In yellow fever, the decrease of the alexin power of serum, is an always constant symptom, which at times is visible already in the first hours of the illness. In one case only, the amount of alexin was normal, though the clinical diagnosis of yellow fever seemed to be justified. We have proved, in the present work, that the serum of this patient, did not show afterwards any preventive properties, which in fact demonstrates that the case was not of yellow fever.

3 .—Though without any proof, one may admit the possibility of existing mild cases in which the dosage of the alexin, as well as clinical symptoms, are unable to support diagnosis of yellow fever.

4 .—In convalescents from yellow fever, the normal amount of alexin in the serum is quickly reestablished. The dosage of the alexin is consequently of no use for a retrospective diagnosis of the illness.

5 .—There are pathological conditions quite different from yellow fever, though somewhat rare, in which the decrease of alexin is marked (acute yellow atrophy of liver, intoxications, malaria (?)), but, at the beginning of severe infectious diseases. (influenza, pneumonia, measles, typhoid fever, etc.) one observes, on the contrary, a slight increase of the amount of alexin in the serum.

6 .—A sensible diminution of alexin has been noted in a single case of malaria. The patient had certainly never suffered from yellow fever.

7.—In five other cases, the amount of alexin was found in decrease, and the clinical diagnosis was influenza, still without pulmonary symptoms. It has not been possible to verify the preventive power of these sera and, consequently, to reject the possibility of being these yellow fever cases.

8 .—Consequently from the examination of the 103 observed cases, the complete agreement of clinical diagnosis with the dosage of alexin is evident in a proportion of 93,27 %. With regard to the 6,8 % disagreeing cases, in 0,97 %, diagnosis by dosage of the alexin was negative and clinical diagnosis positive, but the latter was proved to be wrong; in 0.97 %, the diagnosis by alexin dosage was positive, clinical diagnosis negative, this undoubtedly being exact; in 4,85 %, the diagnosis by dosage of alexin was positive, whereas clinical diagnosis was of influenza, though it has not been possible to make certain which was the right one.

9 .—The dosage of the alexin seems to be of high importance for prognosis, since a more severe case shows a lower amount of alexin in the serum.

10 .—The decrease of the amount alexin of the serum may be attributed chiefly to a loss in the albumin fraction of the alexin (Endstueck).

11 .—Still, without completely excluding the possibility of the alexin decrease in the patient serum being the fact of a fixation *in vivo* of the alexin upon an antigen antibody complex, the hypothesis is available of this being the consequence of a functional disturbance of liver, so that the lowering of the amount of alexin shows deeper the more severe the case is.

12.—Though coinciding many times in yellow fever the coagulability of blood often coincides with the fall of the amount of alexin in the serum, both processes are not connected. In the serum of one fatal case with deep lowering of the alexin percentage, serosym has been found in normal proportion. It has been confirmed, the incoagulability of blood in this illness is chiefly dependent upon the presence of anti-thrombin (Vellard and Vianna).

13.—The thermolabile components of the alexin do not show a proof of an immediate correspondence with the albuminoid component thrombin.

We should not conclude the present work without tendering here our hearty gratitude to Prof. Carlos Chagas and Dr. Carlos B. de Figueiredo for the efficient and fruitful assistance and support they kindly offered to us for its realization.

Mosquitos da região neotropica (Brasil, S. Paulo). I (*)

(Diptera: Culicidae)

pelo

DR. CESAR PINTO

(Com as estampas XXI—XXIII).

Durante a minha permanencia no Laboratorio de Parasitologia da Faculdade de Medicina de São Paulo (1926-1929) tive a opportunidade de fazer algumas excursões pelo interior do Estado com o fim de colher material entomologico e saber quaes as especies de mosquitos peculiares áquella região.

Estudos experimentaes feitos recentemente pelos Drs. Davis e Shannon (1929) na Bahia vieram demonstrar a existencia de novos transmissores da febre amarella no Brasil. O conhecimento da distribuição geographica dos mosquitos adquire cada vez mais uma importancia consideravel em Hygiene e taes estudos ainda estão para merecer a attenção dos estudiosos embora neste sentido já se tenha feito alguma coisa na região neotropica.

Davis e Shannon provaram que a picada e a inoculação do producto de trituração do *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848) é capaz de transmittir a febre amarella ao *Macacus rhesus*. A inoculação do producto de trituração de *Aedes (Ochlerotatus) serratus* (Theo., 1901), previamente infectado com o virus da febre amarella, póde occasionar a morte do *Macacus rhesus*. Com o *Aedes (Taeniorhynchus) taeniorhynchus* (Wied., 1821) os auctores acima referidos só conseguiram uma infecção benigna no macaco. As experiencias de transmissão da febre amarella por intermedio do *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823 foram negativas, tanto pela picada como pela inoculação do producto de trituração dos insectos.

Dou em seguida uma relação das espécies de mosquitos estudadas por mim contendo a distribuição geographica em differentes municipios e cidades do Estado de S. Paulo, sua frequencia e habitos.

Piracicaba

1) *Stegomyia aegypti* (L., 1762). Muicommum nos domicilios. 22-12-1928.

2) *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823. Idem, idem. 22-12-1928.

Araçatuba

1) *Anopheles evansi* (Brèthes, 1926) syn. *A. strodei* Root, 1926. Relativamente commum.

Araraquara (Rincão)

1. *Anopheles argyritarsis* Rob. Desv., 1827. Muito commum nas habitações ruraes durante a noite, raro durante o dia. As larvas são encontradas em grande quantidade nas escavações feitas pelas olarias e nos charcos naturaes. 23-1-1929.

(*) Recebido para publicação a 12 de Fevereiro de 1930.

2. *Anopheles albitarsis* Arribálzaga, 1878. Muito commum. Invade os domicilios á noite e é encontrado durante o dia no interior das casas ruraes. Suga o homem durante o dia em campo aberto e no interior das mattas. As larvas são encontradas nas escavações feitas pelas olarias e nos charcos naturaes.

3. *Anopheles rondoni* (Neiva et Pinto, 1922). Raro em começo de fevereiro. Commum em fins de março. Capturei cerca de 40 exemplares ás 7 horas da noite á beira de um charco distante 50 metros de habitações dos arrabaldes da villa de Rincão. A' noite esta especie invade os domicilios ruraes. 21-3-1929.

4. *Anopheles tarsimaculatus* Goeldi, 1906. Relativamente raro, sendo encontrado pela madrugada e durante o dia no interior das mattas sugando o homem.

5. *Anopheles evansi* (Brèthes, 1926) syn. *A. strodei* Root, 1926. Especie relativamente commum. As larvas vivem nas escavações feitas pelas olarias. Capturei femeas desta especie no interior das mattas, sugando o homem, pela manhã e ao cahir da tarde.

6. *Anopheles lutzii* Osw. Cruz, 1901. Raro. Encontrado ás 6 horas da tarde sugando o homem no interior das mattas. Em Sertãosinho (Fazenda S. Martinho) capturei exemplares femeas desta especie ás 5,30 da tarde, á beira de charcos, sugando cavallo. As casas situadas nas immediações dos fócos das larvas do *A. lutzii* não são invadidas por este mosquito, mesmo durante á noite, o que indica ser uma especie de habitos exclusivamente sylvestres. 3-2-1929.

7. *Anopheles darlingi* (Root, 1926). Muito raro, só capturei um exemplar á noite nas proximidades de charcos, sugando o homem. Janeiro, 1929.

8. *Anopheles fluminensis* Root, 1927. Muito raro, só capturei dois exemplares á noite nas proximidades de charcos, sugando o homem. Janeiro, 1929.

9. *Anopheles maculipes* (Theo., 1903). Muito raro, só capturei tres exemplares á noite nas proximidades de charcos, sugando o homem. Janeiro, 1929.

10. *Chagasia fajardi* (Lutz, 1904). Especie rara. Capturei quatro exemplares durante o dia, á 1,30 da tarde e ao anoitecer, na matta sugando o homem. 4-2-1929.

11. *Stegomyia aegypti* (L., 1762) Extremamente commum em toda a villa de Rincão. As larvas são encontradas na agua das tinas. Um alumno do Grupo Escolar capturou larvas deste mosquito na pia da Igreja. Muito interessante é a presença do *Steg. aegypti* no interior da matta serrada onde capturei exemplares femeas e machos ás 5,30 da tarde. A matta onde encontrei o transmissor da febre amarella distava 310 metros das habitações humanas mais proximas (Est. XXI). A identificação da especie foi feita pelo exame do hypopygio (Ests. XXII e XXIII) por C. Pinto e Costa Lima, excluindo-se portanto a hypothese de se tratar de outra especie do genero *Stegomyia*.

12. *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848) [1]. Relativamente raro. Os adultos desta especie são sylvestres e atacam o homem durante o dia no interior das mattas, conforme observei. 23-1-1929.

13. *Aedes (Ochlerotatus) serratus* (Theo., 1901) [2]. Relativamente commum. Os adultos (femeas) vivem nas mattas e atacam o homem durante o dia e á noite. Não consegui capturar larvas desta especie. 23-1-1929.

---

[1] Transmitte experimentalmente a febre amarella, segundo Davis e Shannon (1929).

[2] Transmitte experimentalmente a febre amarella, segundo Davis e Shannon (1929).

14. *Aedes (Ochlerotatus) fulvus* (Wied., 1828). Raro. Capturei femeas deste mosquito ás 10,30 da manhã sugando o homem em dia de chuva, no interior da matta. 6-2-1929.

15. *Aedes (Conopostegus) leucocelaenus* (Dyar et Shannon, 1924). Especie rara em 6-2-1929. Capturei exemplares femeas ás 5 horas da tarde, sugando o homem, no interior da matta.

16. *Culex (Culex) quinquefasciatus* Say, 1823. Muito commum no interior das habitações humanas. 23-1-1929.

17. *Culex (Culex) coronator* Dyar et Knab, 1906. Muito commum nas zonas ruraes. As larvas são extremamente communs nas aguas existentes nas escavações feitas pelas olarias. 23-1-1929.

18. *Culex (Melanoconion) atratus* (Theo., 1901). Raro. Capturei adultos ás 6 horas da tarde, sugando o homem, no interior da matta. 10-2-1929.

19. *Mansonia (Rhynchotaenia) venezuelensis* (Theo., 1912). Esta especie ainda não havia sido observada no Brasil. Ataca o homem á noite nas immediações dos charcos. 23-1-1929.

20. *Mansonia (Rhynchotaenia) juxtamansonia* (Chagas, 1907). Relativamente commum. E' interessante assignalar que os machos desta especie têm o habito de pousar sobre o homem, á noite, attrahidos pela luz, nos lugares proximos dos charcos, conforme tive a opportunidade de observar. As femeas sugam o homem, á noite nas immediações dos pantanos. 23-1-1929.

21. *Mansonia (Rhynchotaenia) albicosta* (Chagas, 1908). Rara. Colhi larvas provenientes da agua existente nas escavações feitas pelas olarias. As femeas sugam o homem, á noite nas proximidades dos charcos. 23-1-1929.

22. *Mansonia (Rhynchotaenia) fasciolata* (Arribálzaga, 1891). Relativamente commum. Suga o homem á noite nos lugares proximos dos pantanos. 23-1-1929.

23. *Mansonia (Mansonia) titilans* (Walker, 1848). Rara. Suga o homem á noite nos lugares proximos dos charcos. A picada deste mosquito é extremamente dolorosa. 23-1-1929.

24. *Lutzia bigoti* (Bellardi, 1862) syn.? *L. brasiliae* Dyar, 1923. O exame do hypopygio e das larvas provenientes de Rincão comparado com os oriundos de Manguinhos são absolutamente iguaes e concordam anatomicamente com o da *Lutzia bigoti*, conforme exame feito por Costa Lima e Cesar Pinto. E' muito provavel que *brasiliae* seja identica á *bigoti*.

Esta especie é extremamente commum nos charcos proximos da villa de Rincão. Encontrei larvas de *Lutzia bigoti* nos quintaes das casas daquella villa. As larvas deste mosquito são cannibaes e destroem grande numero de exemplares quando misturadas no mesmo vidro. Os adultos sugam o homem á noite no interior das mattas. 23-1-1929. Nos mezes de dezembro, janeiro e fevereiro os adultos são raros, em março porém são communs.

25. *Psorophora (Psorophora) ciliata* (Fabr., 1794). Rara em 3-2-1929. Capturei exemplares femeas, á noite, proximo das mattas sugando o homem. A picada deste mosquito é extremamente dolorosa.

26. *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (von Humboldt, 1820). Muito commum. Os adultos (femeas) encontram-se durante o dia e á noite no interior das mattas e sugam o homem com grande avidez. Tive a opportunidade de observar exemplares femeas desta especie no interior dos domicilios das zonas ruraes, á noite, pousados sobre as paredes das casas. Os predios referidos ficavam a poucos metros de diversos charcos. 4-2-1929.

27. *Psorophora (Janthinosoma) lutzii* (Theo., 1901). Os adultos (femeas) encontram-se durante o dia e á noite no interior das mattas e atacam o homem com grande avidez. 4-2-1929.

28. *Psorophora (Grabhamia) cingulata* (Fabr., 1805). As larvas são encontradas raramente nas escavações feitas pelas olarias, os adultos (femeas) são communs no interior da matta onde sugam o homem. 23-1-1929.

29. *Psorophora (Grabhamia) confinis* (Arrib., 1891). Rarissima nos mezes de dezembro e janeiro, em fevereiro tornou-se muito commum. Os adultos (femeas) sugam o homem durante o dia no interior das mattas.

30. *Sabethes albiprivus* Theobald, 1903. Raro em 10-2-1929. Mosquito muito arisco. Capturei femeas ás 12 horas da manhã, sugando o homem, no interior da matta.

31. *Sabethoides chloropterus* (von Humboldt, 1820). Raro em 10-2-1929. Capturei exemplares femeas ás 6 horas da tarde, no interior da matta, sugando o homem.

32. *Wyeomyia (Wyeomyia) oblita* (Theo., 1907). Especie relativamente commum. Os adultos (femeas) vivem no interior das mattas e sugam o homem durante o dia. 4-2-1929.

Ribeirão Preto (Guatapará)

1. *Anopheles albitarsis* Arribálzaga, 1878. Especie muito commum. Encontrada durante o dia, ás 10 horas da manhã e ao cahir da tarde, á beira dos charcos ou nas margens do Rio Mogy-Guassú, sugando o homem com grande avidez. Capturei exemplares femeas no interior das casas proximas dos charcos, ás 9,30 horas da manhã. 2-2-1922.

2. *Anopheles tarsimaculatus* Goeldi, 1906. Relativamente commum. Capturei exemplares femeas no interior das casas proximas dos charcos, ás 9,30 horas da manhã. 2-2-1929.

3. *Aedes (Ochlerotatus) scapularis* (Rondani, 1848) [3]. Relativamente commum. Capturei exemplares femeas durante o dia no interior das mattas, sugando o homem. 21-1-1929.

4. *Psorophora (Janthinosoma) ferox* (von Humboldt, 1820). Muito commum. Capturei exemplares femeas ás 7 horas da noite, no interior das casas proximas dos charcos ou nas margens do Rio Mogy-Guassú. Este mosquito aggride o homem com grande avidez. 2-2-1929.

5. *Psorophora (Janthinosoma) discrucians* (Walker, 1856). Muito commum. Capturei exemplares femeas ás 7 horas da noite, no interior das casas proximas dos charcos ou nas margens do Rio Mogy-Guassú. 2-2-1929.

6. *Psorophora (Janthinosoma) lutzii* (Theo., 1901). Relativamente commum. Capturei exemplares femeas, durante o dia, no interior das mattas, sugando o homem. 2-2-1929.

7. *Mansonia (Mansonia) titilans* (Walker, 1848). Relativamente rara. Capturei exemplares femeas durante o dia, sugando o homem, no interior das mattas.

Sertãosinho (Martinho Prado. Fazenda S. Martinho)

1. *Anopheles albitarsis* Arribálzaga, 1878. Relativamente commum. Capturei exemplares femeas ás 5,30 da tarde, á beira de charcos, sugando cavallo. 2-2-1929.

2. *Anopheles evansi* (Brèthes, 1926) syn. *A. strodei* Root, 1926. Relativamente commum. Capturei exemplares femeas ás

[3] Transmitte experimentalmente a febre amarella, segundo Davis e Shannon (1929).

5,30 da tarde, á beira de charcos, sugando cavallo. 2-2-1929.

3. *Anopheles lutzii* Osw. Cruz, 1901. Relativamente commum. Especie sylvestre, jamais invadindo as habitações humanas embora estas estejam situadas nas immediações dos charcos, conforme tive a opportunidade de observar. Capturei exemplares femeas ás 5,30 da tarde, á beira de charcos, sugando cavallo. 2-2-1929.

Campinas. Estação de Nova Odessa

1. *Stegomyia aegypti* (L., 1762). A's 11,15 da manhã capturei um exemplar femea que durante a curta parada do trem penetrou no carro procurando me sugar immediatamente. 11-21-1929.

Barretos. Cachoeira do Marimbondo

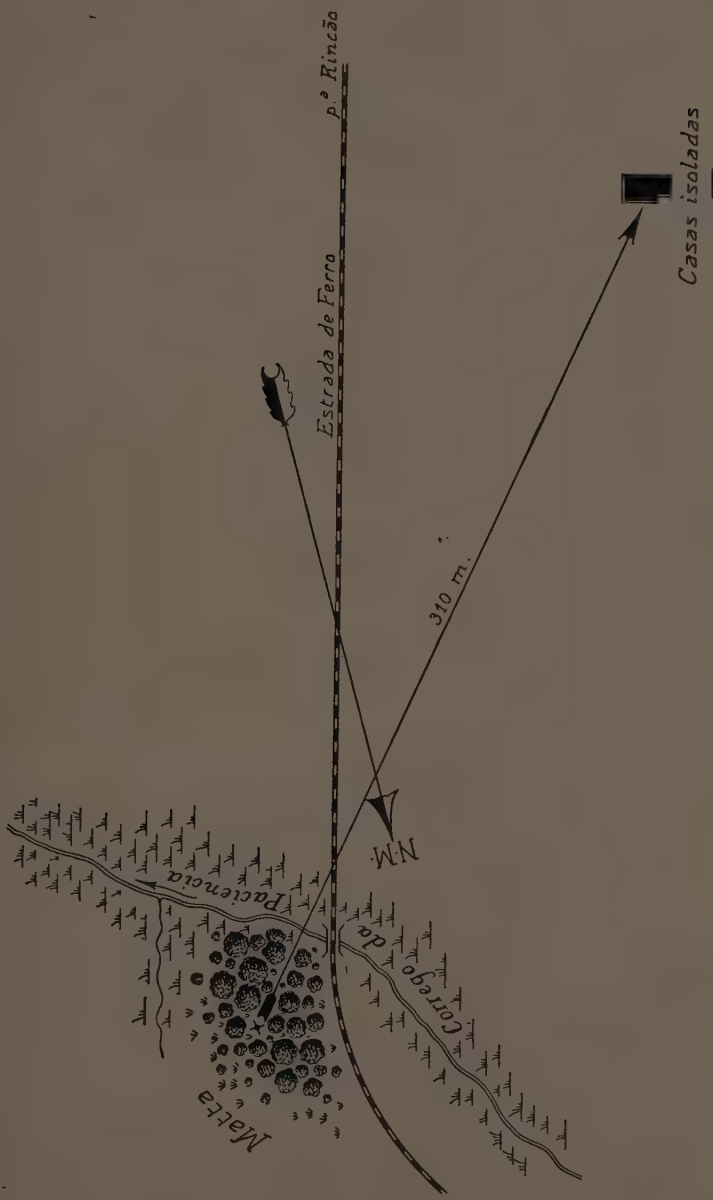
1. *Anopheles argyritarsis* Rob. Desv., 1827. Muito commum. Capturei exemres femeas ás 10 horas da manhã (temperatura de 14°C.) no interior das casas proximas dos fócos de larvas constituidos por escavações existentes nas pedras. 15-5-1926.

2. *Anopheles albitarsis* Arribálzaga, 1878. Muito commum. Capturei exemplares femeas ás 10 horas da manhã (temperatura de 14°C) no interior das casas proximas dos fócos de larvas constituidos por escavações existentes nas pedras. 15-5-1926.

3. *Anopheles evansi* (Brèthes, 1926) syn. *A. strodei* Root, 1926. Muito commum. Capturei exemplares femeas ás 10 horas da manhã (temperatura de 14°C) no interior das casas proximas dos fócos de larvas constituidos por escavações existentes nas pedras. 15-5-1926.

4. *Psorophora (Janthinosoma) lutzii* (Theo., 1901). Relativamente raro. Criado de larva proveniente de charcos. 15-5-1926.

Manguinhos, 3-2-1930.



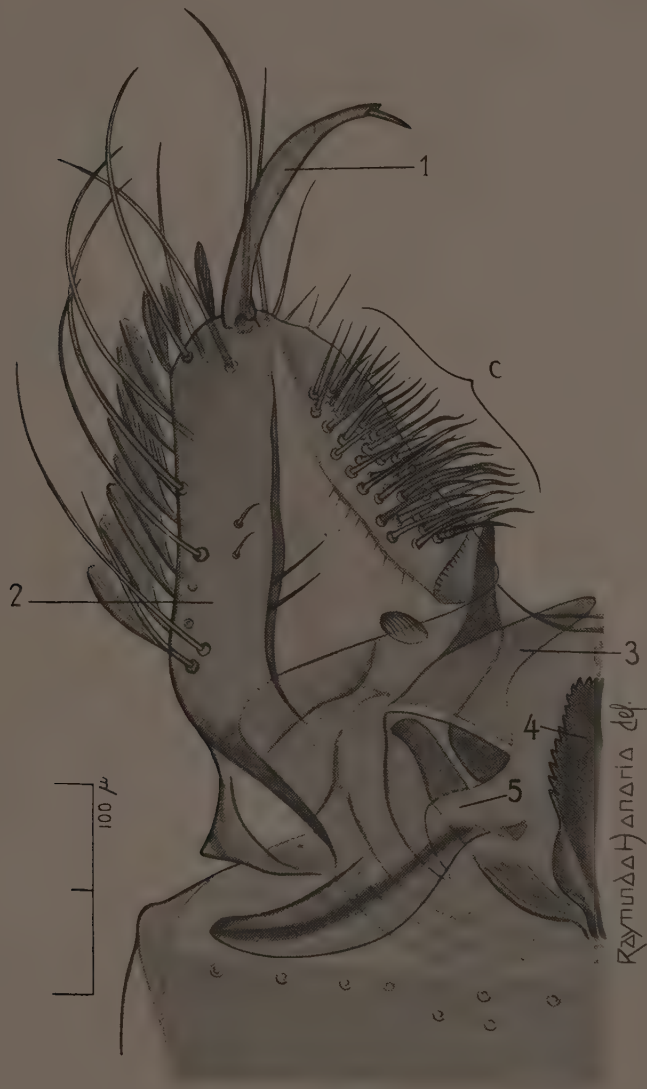
Levantamento topographico das proximidades da villa de Rincão (Est. de S. Paulo) mostrando a matta onde o autor capturou machos e femeas de *Stegomyia aegypti* (L., 1762) durante o dia. Levantamento topographico feito pelo Engenheiro Malhado Quirino.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz

Photomicrographia da genitalia ou caudalia de *Stegomyia aegypti* (L., 1762) capturado no interior da matta em Rincão (Est. de S. Paulo). Original.

Photo J. Pinto

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz



Desenho da parte esquerda da genitalia ou caudalia de *Stegomyia aegypti* (L., 1762) capturado no interior da matta em Rincão (Est. de São Paulo).

1 pinça *(clasper)*; 2 peça lateral; 3 decimo esternito; 4 mesosoma; 5 ramo basal do mesosoma; *c* cerdas curtas e fortes implantadas no lado interno da peça lateral. Original.

Dr. Cesar Pinto: Mosquitos da região neotropica. I.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz

Sobre insectos que vivem em maracujás (Passiflora spp.) (*)

pelo

DR. A. da COSTA LIMA

(Com as estampas XXIV—XXVI).

São bem conhecidas as plantas do genero *Passiflora*, de frutos comestiveis, vulgarmente chamados «maracujás». No Rio de Janeiro existe e é aproveitada mais commummente a *Passiflora quadrangularis*. Vê-se tambem, especialmente na Baixada Fluminense, a especie *P. edulis* de frutos menores e esphericos, geralmente empregada para reforçar e ornamentar as cercas [1]. Em Estrella (E. do Rio), em pés desta ultima planta, tenho colhido varios insectos, uns que nelles pousam accidentalmente, outros que vivem dos mesmos ou cujas larvas se desenvolvem nos frutos.

Dentre os do segundo grupo, ha dois mais interessantes, que podem ser considerados inimigos da *Passiflora edulis*.

O primeiro é o coreideo, da tribu *Anisoscelini*, *Holymenia clavigera* (Herbst). Este hemiptero, de aspecto curioso, pois lembra, principalmente quando se movimenta, um hymenoptero ichneumonideo, comporta-se semelhantemente ao *Diactor bilineatus* (Fabr.), outro anisoscelineo, de aspecto não menos curioso, habitualmente observado na *Passiflora quadrangularis*.

Não procurei estudar, em seus detalhes, a biologia desse coreideo, todavia, observando-o, pude verificar que é frequentemente parasitado por um chalcidideo, que, até agora, só se conhecia pela descripção original, aliás muito bem feita em 1891 por Ashmead (Ins. Life, 3, 455-457), de exemplares apanhados em Chapada (Brasil) por H. Smith.

Refiro-me ao encyrtideo *Hexacladia smithii*. A femea desta especie provavelmente faz as posturas no abdomen das formas jovens do coreideo, realisando-se, no interior dessa parte do corpo, todo o desenvolvimento dos parasitos. Quando estes ficam adultos—o que se observa quando tambem já é adulto o hospedador—os endophagos furam a parede dorsal do abdomen e sahem. Verifiquei tambem que a *H. smithii* igualmente parasita o scutellerideo *Pachycoris torridus* (Scop.). Nesta especie, porém, criam-se mais parasitos no abdomen das formas jovens, cerca de uma dezena de individuos, emquanto que de uma *Holymenia* sahem, quasi sempre, 4 microhymenopteros.

Tanto em *Holymenia* como em *Pachycoris*, parecem ser igualmente infestados os individuos dos dois sexos. O interessante é que os percevejos parasi-

[1] Os meus agradecimentos ao illustre botanico Sr. O. Kuhlmann, que determinou as especies de *Passiflora*.

(*) Recebido para publicação a 12 de Fevereiro de 1930.

tados apresentam-se apparentemente normaes até o momento da libertação dos parasitos. Nota-se, apenas, quando estes iniciam a perfuração do abdomen da victima, que esta fica um tanto mais agitada, expandindo, de quando em vez, as azas.

Quando isto se dá, não raro se vê sahir um ou 2 microhymenopteros. Em se tratando de especimens de *Pachycoris torridus,* como o escutello deste insecto encobre, com uma couraça, toda a parte dorsal do abdomen, e sendo sempre esta a parte perfurada pelos parasitos é preciso, para que elles possam sahir, que o insecto parasitado distenda as azas, de modo a se abrir o espaço entre o escutello e o abdomen.

Si, por uma causa qualquer, o *Pachycoris* morre prematuramente, os parasitos, embora completamente desenvolvidos e tendo perfurado o abdomen, ficam presos sob o escutello por não poderem atravessal-o. E' facil, entretanto, deixal-os escapar, entreabrindo com um instrumento qualquer o espaço entre o abdomen e o escutello.

Logo após ter cessado a emergencia dos parasitos, o hemiptero parasitado, que até então se mostrava apparentemente são ou mesmo mais vivaz, torna-se inactivo e morre no fim de pouco tempo. Dissecando-se-lhe o abdomen, encontra-se-o quasi totalmente esvasiado, não sendo mais possivel distinguir-se os orgãos da cavidade abdominal, que ficam totalmente lesados pelas larvas dos parasitos.

Tentei estudar os habitos da *Hexacladia smithii,* procurando mantel-a em captiveiro e alimentando-a com mel de abelhas, como habitualmente tenho feito com outras especies de microhymenopteros. Não obtive, porém, o mesmo successo, pois, os insectos, raramente permaneceram vivos mais de 24 horas.

O caso de parasitismo que acabo de tratar é bem interessante. De facto, na extensa bibliographia que pude consultar, não encontrei referencia alguma ao ataque de formas jovens ou nymphas de hemipteros (heteropteros) por microhymenopteros. Seria tambem interessante, para quem tenha o ensejo de encontrar abundante material de *Pachycoris,* de *Holymenia* ou de outro qualquer hemiptero, que tambem seja infestado pela *Hexacladia smithii,* averiguar si se apresentam modificações nos caracteres sexuaes dos individuos parasitados, especialmente dos machos, determinadas pela acção das larvas de *Hexacladia* sobre as gonadas, analogas ás que foram bem estudadas por Kornhauser [2] no membracideo *Thelia bimaculata* (Fabr.), quando parasitado pelo microhymenoptero endophago *Aphelopus theliae* (Gahan) e que se enquadram na ordem de phenomenos geralmente descriptos sob o titulo de castração parasitaria.

O segundo insecto, observado, aliás bem prejudicial aos maracujás de Estrella, é uma mosca da familia *Trypetidae,* até agora não mencionada na nossa litteratura entomologica. Trata-se, indubitavelmente, da *Anastrepha consobrina* (Loew, 1873), descripta de um exemplar proveniente do Brasil.

E' uma especie que tem grandes affinidades com a *A. fratercula* (Wied.) e maiores ainda com a *A. parallela* (Wied.), com a *A. integra* (Loew), ambas do Brasil, e com a *A. ludens* (Loew), uma das maiores pragas da pomicultura no Mexico.

Abstenho-me de redescrevel-a, pois a diagnose especifica, apresentada por Loew, posto que resumida, é perfeita. Pela disposição das nervuras, especial-

[2] Kornhauser, S. I. The sexual characteristics of the membracid *Thelia bimaculata* (Fabr.). I—External changes induced by *Aphelopus theliae* (Gahan). 1919. J. of Morph., 32 : 531 – 636).

mente a curvatura mais accentuada da *R4+5*, além da nervura transversa *r-m*, e o vestigio de ondulação na *R2+3*, ella muito se assemelha a *A. parallela*. Entretanto, em *A. parallela*, a relação de comprimento do oviscapto com o resto do corpo é de 1: 1,8—1,9, emquanto que em *A. consobrina* é de 1: 1,2—1,4.

De *A. fratercula* ella apenas se distingue pelo comprimento do oviscapto, que em *fratercula* é, relativamente, bem mais curto (de 1: 2,6 a 1: 3,2).

A disposição das nervuras ha pouco mencionada é muito semelhante nas duas especies, havendo tambem especimens de *fratercula* cujas manchas são inteiramente identicas, na forma e no colorido, ás de *A. consobrina* (v. figuras que apresento).

A *A. integra* é uma outra especie tambem muito semelhante a *A. consobrina*. As femeas, porém, apresentam a terebra, ou ovipositor, ainda mais alongado (relação com o resto do corpo 1: 1,1). Considerando esta relação como caracter principal, só tenho conhecimento de uma especie de *Anatropha* que pode ser confundida com a *A. integra;* refiro-me á *Anastropha barnesi* Aldrich 1926, aliás, ao meu ver, difficilmente distinguivel de *A. integra* pelos demais caracteres morphologicos.

Da *A. ludens*, que é a outra especie affim com *A. consobrina*, ella se distingue principalmente, como aliás tambem se verifica com as outras especies de *Anastrepha*, pelo comprimento do ultimo urotergito nos machos, que em *ludens* é muito mais comprido que os dois precedentes reunidos. Em *A. consobrina* o ultimo urotergito é de comprimento igual ao dos 2 precedentes juntos. Quanto ao comprimento do oviscapto, quasi não se pode notar differença nas duas especies, pois a relação com o resto do corpo em *ludens* é approximadamente de 1: 1,5. O desenho das azas nas duas especies, é praticamente identico.

A *Anastrepha consobrina*, na phase adulta, comporta-se como as demais especies de *Anastrepha*. Em captiveiro, alimentando-a a mel, ella se mantem viva pouco mais de 30 dias. Nestas condições as femeas, apezar de bem alimentadas e em contacto com machos, por causa que não pude averiguar, nem sempre se mostram dispostas a fazer posturas em frutos apanhados. Tambem nunca os vi em copula. O facto, aliás, já fôra observado por C. Riley [3], quando estudou os habitos da *A. ludens*.

De uma feita, deixei em presença de femeas e machos de *A. consobrina* frutos de *Passiflora edulis*, colhidos em via de amadurecimento e alguns verdes de *Passiflora quadrangularis*. No fim de 15 dias, por estarem quasi todos murchos e alguns em começo de decomposição, retirei-os e examinei-os, sem nelles encontrar uma larva sequer.

Logo em seguida (10 de janeiro) colloquei novos frutos de *P. edulis*, achando-se um delles ainda verde, embora de tamanho igual ao dos frutos maduros.

Não tive o ensejo de observar posturas, porém, a 24 de Janeiro, vi que o fruto verde apresentava uma area de côr mais carregada. Abrindo-o, encontrei-o cheio de larvas bem desenvolvidas. No dia seguinte, 5 larvas perfuraram esse fruto e se transformaram em puparios.

No dia 27, á tarde, emergiram do mesmo fruto outras 5 larvas, que encontrei á 28, pela manhã, transformadas em puparios.

Não sendo provavel que o referido fruto verde já estivesse parasitado a 10 de janeiro, sou levado a acreditar que o desenvolvimento do insecto, de ovo a pupario, se tenha realisado entre 10 e 24 de janeiro.

Em condições naturaes encontram-se larvas bem desenvolvidas, prestes a pu-

---

[3] Riley, C. V. 1888. The morelos orange fruit-worm (*Trypeta ludens* Loew.). Ins. Life, 1: 45—47.

par, em frutos desenvolvidos em qualquer estado de maturação: ainda verdes, amadurecendo ou já totalmente maduros. Em cada fruto atacado podem existir de 1 a 10 larvas igualmente desenvolvidas.

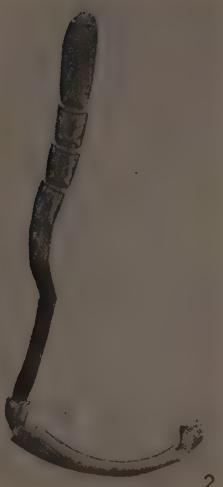
As larvas, quando completamente desenvolvidas, saem do fruto, atravéz de um orificio feito na casca por uma dellas e penetram no sólo, onde se transformam, após algumas horas, em puparios. A phase pupal dura de 20 a 21 dias.

Ao terminar esta nota devo ainda dizer algumas palavras sobre a larva de *A. consobrina*. A larva, prestes a pupar, mede cerca de 10 mm. e é de côr amarella-alaranjada. E' muito parecida com a larva de *A. fratercula* [1]. O lobulos annaes formam um tuberculo unico largamente sulcado no meio. O aspecto das placas estigmaticas e das peças buccaes pode ser apreciado nas photomicrographias. Os estigmas anteriores apresentam cerca de 12 a 15 tubulos.

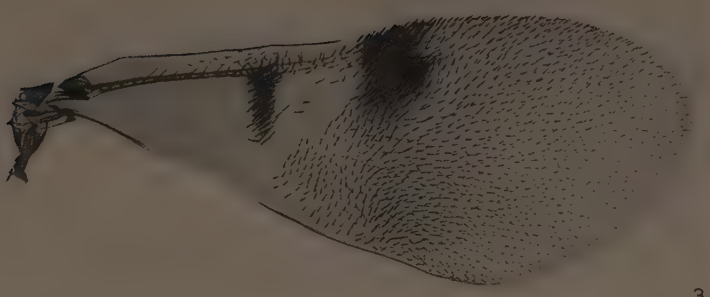
[1] Para um estudo comparativo com outras larvas de *Anastrepha*, devem ser consultados os seguintes trabalhos: Banks, N. 1912. The structure of certain dipterous larvae with particular reference to those in human foods. U. S. Dept. Agric., Bur. Entom., Tech. Ser., 22: 44 p. Greene, Charles T. 1929. Characters of the larvae and pupae of certain fruit flies. J. Agric. Res., 38: 489–504.

Typ. do Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro — Brasil.

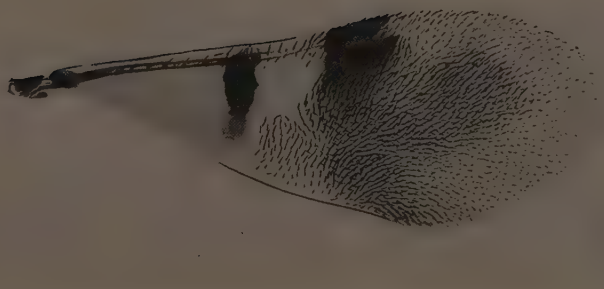
1



2



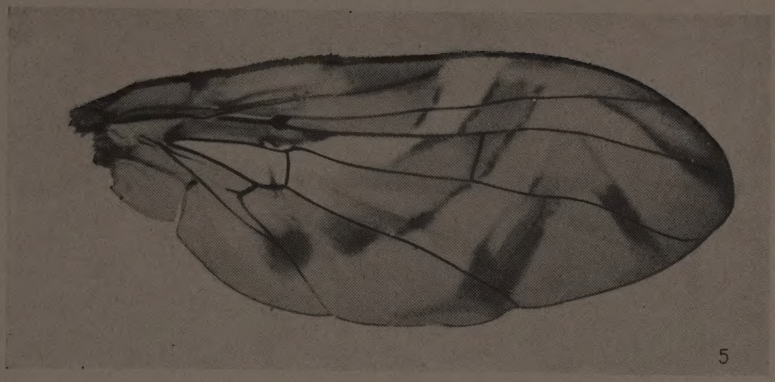
3



4

Fig. 1—*Hexacladia smithii.* Antenna do ♂ (× 50)
Fig. 2—*Hexacladia smithii.* « « da ♀ (× 50)
Fig. 3—*Hexacladia smithii.* Aza anterior do ♂ (× 50)
Fig. 4—*Hexacladia smithii.* « « da ♀ (× 50)

Photo J. Pinto.



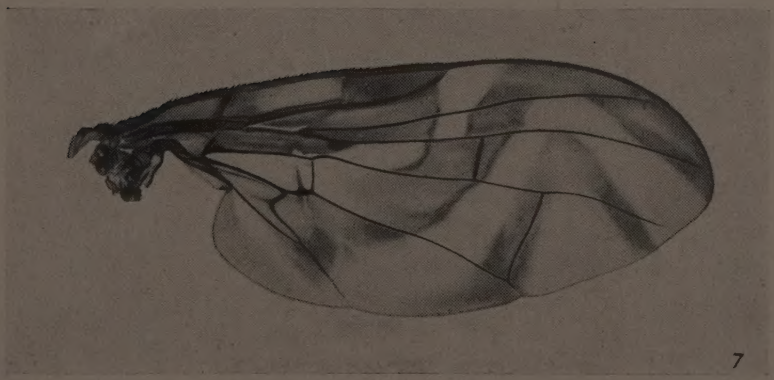


Fig 5—Aza de *Anastrepha consobrina* (× 10)
Fig. 6—*Anastrepha consobrina* ♀ (× 4)
Fig. 7—Aza de *Anastrepha fratercula* (× 10)

Photo J. Pinto.

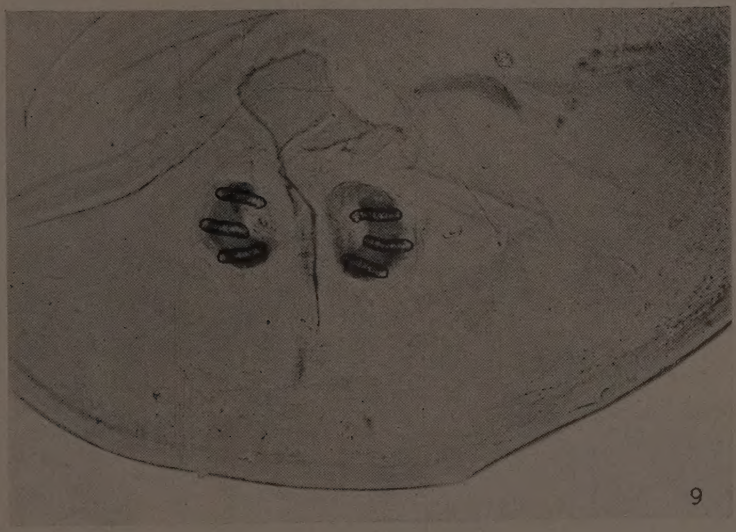


Fig. 8—Extremidade anterior (esqueleto cephalopharyngeo) da larva completamente desenvolvida de *Anastrepha consobrina*, com os estigmas anteriores (× 68).
Fig. 9—Extremidade posterior da mesma, com os estigmas posteriores (× 68).
Photo J. Pinto.